

SEGREGATIONSUNTERSUCHUNGEN
DER HLA-KOPPLUNGSGRUPPE

Harald Lorenz

1977

Aus der Kinderpoliklinik der Universität München

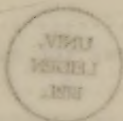
Direktor: Prof.Dr.med. H. S p i e s s

SEGREGATIONSUNTERSUCHUNGEN DER HLA-KOPPLUNGSGRUPPE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Harald L o r e n z

aus

Kreuth

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doiz.Dr.med. E.D. A l b e r t

Mitberichterstatter: Professor Dr.med. H. S p i e s s

Dekan: Professor Dr.med. W. S p a n n

Tag der mündlichen Prüfung: 28.6.1977



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1) Einleitung	1
1)1) HLA und Transplantationen	2
1)2) HLA und Erkrankungen	3
1)3) HLA und Populationsgenetik	4
1)4) HLA in der Paternitätsserologie	4
1)5) Die HLA-Kopplungsgruppe auf C6	5
1)5)1) MLC	5
1)5)2) PGM ₃	6
1)5)3) Bf-System	6
1)5)4) GLO	6
1)5)5) Komplement-Komponenten	7
2) Methodik	8
2)1) Seren	8
2)2) Testmethoden der Gewebstypisierung	10
2)2)1) LAT	10
2)2)2) Thrombozyten-KBR	11
2)2)3) LCT	12
2)3) MLC	15
2)4) Bf-System	16
2)5) PGM ₃	17
2)6) Materialbeschaffung (Familien)	18

	Seite
3) Einführung in die HLA-Genetik	19
3)1) Bedeutung als Transplantationsantigene ..	19
3)2) Drei Genorte mit multiplen Allelen. Der Haplotyp als Vererbungseinheit	19
3)3) Vererbung	20
3)4) Bestimmung des Genotyps bei Vorliegen von serologisch nicht zu definierenden oder unbekannten Antigenen	21
3)5) Kopplungsungleichgewicht	22
3)6) Familienanalyse	23
3)7) Serologie	23
3)8) Rekombinationen	24
3)9) Weitere Marker auf dem Chromosom Nr.6 ...	24
3)9)1) MLC	24
3)9)2) Bf-System	25
3)9)3) PGM ₃	26
4) Ergebnisse	27
4)1) Phänotypen und Genotypen	27
4)1)1) Berechnung unklarer Haplotypen aus den Phänotypdaten (Maximum-Likelihood-Methode).....	28
4)1)2) Bestimmung der Phänotyp- und -Genfrequenzen-Methodik	29
4)1)2)1) Phänotypfrequenzen- -Ergebnisse	30
4)1)2)2) Genfrequenzen-Ergebnisse	31
4)1)3) Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	32

	Seite
4)2) Haplotypfrequenzen und Delta-Werte	36
4)2)1) Methodik	36
4)2)2) Ergebnisse	37
4)2)3) Ermittlung d.Haplotypfrequenzen mittels Berechnung aus den Phäno- typdaten, durchgeführt für die häufigsten Haplotypen	39
4)3) Segregationsanalyse	40
4)3)1) Segregation einzelner Antigene ..	40
4)3)2) Segregation von Haplotypen	43
4)3)3) Segregation von einzelnen Haplo- typen in Familien versch.Größe ..	44
4)3)4) Aufteilung der Haplotyp-Kombi- nationen i.Fam.versch.Größe	46
4)3)5) Aufteilung von väterlichen und mütterlichen Haplotypen in Fam. verschiedener Größe	47
4)3)6) HLA-Identität von erstem und letztem Kind	49
4)4) Bf-System	50
4)4)1) Bf-Genfrequenzen	50
4)4)2) Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	51
4)4)3) Assoziation HLA-Bf	51
4)4)4) HLA-Bf-Haplotypfrequenzen	53
4)4)5) Frequenzen von ausgewählten HLA-Bf-Haplotypen mit zugehörigen Delta-Werten	54
4)4)6) HLA-Bf-Dreipunkt-Haplotypen mit zugehörigen Delta-Werten	54
4)5) PGM ₃	56

	Seite
4)6) Rekombinationen	57
4)6)1) Rekombinationen i. HLA-System ..	57
4)6)2) Rekombinationen zw.HLA-B u.Bf ..	58
4)6)3) Rekombinationen zw.HLA-B u.PGM ₃	58
5) Diskussion	59
5)1) Ableitung v.Gen- u.Haplotypfrequenzen, Hardy-Weinberg-Gleichgewicht sowie Kopplungsungleichgewicht	60
5)2) Segregationsanalyse	63
5)3) Polymorphismus des HLA-Systems	65
5)4) Andere Marker auf dem Chromosom Nr.6 ..	66
5)5) Rekombinationen	67
6) Zusammenfassung	69
7) Literaturverzeichnis	75
8) Lebenslauf	91

1) EINLEITUNG

Die Bearbeitung des HLA-Systems, also des Systems der menschlichen Leukozytenantigene, wurde in den letzten Jahren sehr intensiv betrieben. Die Leukozytenantigene fungieren als Transplantationsantigene und spielen somit unter anderem bei der immunologischen Spenderauswahl eine wichtige Rolle.

Bereits 1938 hatte G o r e r (46) gefunden, daß nach Abstoßung von Hauttransplantaten Antikörper produziert wurden, die mit Spenderleukozyten reagierten.

Im Jahre 1946 war es M e d a w a r (57) gelungen, durch intradermale Injektion von Leukozyten bei Mäusen eine spezifische Immunisierung gegen Transplantationsantigene zu induzieren. Diese äußerte sich in einer beschleunigten Abstoßung von Hauttransplantaten.

Ähnliche Verhältnisse wurden 1961 von F r i e d m a n n et al. (43) beim Menschen nachgewiesen. Der Beweis dafür, daß die Überlebensdauer von Hauttransplantaten vom Grad der Verwandtschaft zwischen Spender und Empfänger abhängt, gelang C e p p e l l i n i et al. 1967 (26). Danach vergrößert sich die Wahrscheinlichkeit eines Überlebens für das Transplantat mit der Anzahl der zwischen Spender und Empfänger kompatiblen Antigene.

D a u s s e t (34) entdeckte bereits 1952 im Serum polytransfundierter Patienten agglutinierende Antikörper, die nur mit Leukozyten, nicht aber mit Erythrozyten reagierten. Doch erst 1958 beginnt die eigentliche Geschichte des HLA-Systems, und zwar mit der Beschreibung des Antigens MAC, ebenfalls durch D a u s s e t (35). Van R o o d (79) beschrieb im Jahre 1962 das erste diallelische System und zwei Jahre danach be-

richteten P a y n e und B o d m e r (66) über das multiallelische "IA"-System, die Grundlage des heutigen ersten Locus des HLA-Systems (HLA-A).

Während des dritten internationalen Histokompatibilitäts-Workshops 1967 in Turin konnte mit Hilfe von Familienuntersuchungen gezeigt werden, daß der Großteil der Leukozytenantigene einem einzigen komplexen immunogenetischen System angehört. Weiterhin wurde bewiesen, daß dieses System von der Region eines einzigen Autosomenpaares genetisch determiniert wird. Vom Nomenklaturkomitee der WHO erhielt es die offizielle Bezeichnung "HLA" (= Human Leucocyte Antigen oder Histocompatibility Locus A).

Der vierte Histokompatibilitäts-Workshop 1970 in Los Angeles brachte schließlich die Beweise für die Unterteilung des HLA-Systems in zwei Loci mit jeweils multiplen Allelen (Joint report, 1970).

Im Laufe der letzten Jahre gelang die Entdeckung von weiteren HLA-Spezifitäten, alle zu einem der beiden Loci gehörend (A l b e r t et al. 1970, 1972, (1)(2)). Außerdem konnte ein dritter HLA-Locus (HLA-C) gefunden werden. (S v e j g a a r d et al. 1973, (89); M a y r et al. 1974, (53)).

1)1) HLA und Transplantationen

Große Bedeutung besitzt das HLA-System zur Zeit für die Organtransplantation. Es ist neben dem ABO-Blutgruppensystem der wichtigste genetische Faktor für Erfolg oder Mißerfolg einer Transplantation (3; 28; 39).

Schon die ersten Versuche in dieser Richtung brachten die Erkenntnis, daß Transplantate von verwandten Individuen, insbesondere von Geschwistern, eine erheblich

bessere Überlebenszeit aufweisen als die von nicht verwandten Individuen (C e p p e l l i n i et al. 1967, (26)). Studien an Hauttransplantaten zeigten, daß die längsten Überlebenszeiten bei HLA-identischen Geschwistern zu erzielen sind. (C e p p e l l i n i et al. 1971, (28); D a u s s e t J. et al. 1970 (39)). Auch bei Nierentransplantationen (M i c k e y. et al. 1971, (61); D a u s s e t et al. 1972, (40); van H o o f f et al. 1972, (48); O l i v e r et al. 1972, (63)) und Knochenmarktransplantationen (S t o r b et al. 1972, (84)) konnte der Grad der Kompatibilität für HLA-Antigene in eindeutige Beziehung zum klinischen Erfolg gesetzt werden.

Nicht so eindeutig ist diese Korrelation bei der Transplantation von Organen nicht verwandter Unfallopfer. Doch auch hier konnten statistisch signifikante Ergebnisse erzielt werden (D a u s s e t et al. 1972, (40)). Vor allem Transplantationen, die mit Nieren von nicht verwandten, aber HLA-identischen Spendern durchgeführt wurden, weisen sehr gute Erfolge auf (van H o o f f et al. 1972, (48)). Wegen des ausgeprägten Polymorphismus des HLA-Systems ist es verständlicherweise sehr schwierig, derartige HLA-identische Individuen zu erfassen, wenngleich dies im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung der Organtransplantation sehr wünschenswert wäre.

1)2) HLA und Erkrankungen

Angeregt durch Befunde bei Tierstudien - so gibt es bei Mäusen Anhaltspunkte dafür, daß ihre Empfänglichkeit für einige Leukämieviren mit bestimmten Allelen des Histokompatibilitätssystems korreliert ist: Groß-Leukämievirus (A m i e l 1967, (15); W a l f o r d et al.

1971, (96)) - begann auch beim Menschen die Suche nach Beziehungen zwischen HLA-Antigenmustern und gewissen Erkrankungen (P a t e l et al. 1969, (64); M i c k e y et al. 1970, (60)).

Tatsächlich fanden sich in den letzten Jahren eine Vielzahl von Erkrankungen, die statistisch hochsignifikante Assoziationen zu bestimmten HLA-Antigenen aufweisen. Besondere Bedeutung haben in dieser Beziehung die Spondylitis ankylopoetica (Morbus Bechterew), assoziiert mit HLA-B27 (T r u o g et al. 1975, (95)), der juvenile Diabetes mellitus (HLA-B8, -BW15 u. evtl. -BW18; C h r i s t y et al. 1976, (29); C u d w o r t h et al. 1976, (32)) und die Multiple Sklerose (HLA-A3, -B7, -DW2; B e r t r a m s et al. 1975, (19)) erreicht. Bei einer wachsenden Zahl von Krankheiten mit immunologischen und genetischen Aspekten werden HLA-Assoziationen gefunden.

1)3) HLA und Populationsgenetik

Was die Populationsgenetik betrifft, so können repräsentative Populationsstudien über die Häufigkeitsverteilung der HLA-Antigene in bestimmten Bevölkerungsgruppen zur Klärung anthropologischer Fragen beitragen (Histocompatibility Testing 1972, Munksgaard, Copenhagen).

1)4) HLA in der Paternitätsserologie

Darüber hinaus ist das HLA-System dank seines extremen Polymorphismus in besonderem Maße für die Paternitätsserologie geeignet. Bei Vaterschaftsgutachten kann die Berücksichtigung der HLA-Erbeigenschaften zu einer

deutlichen Vergrößerung der Ausschlußwahrscheinlichkeit für Nichtväter führen.

1)5) Die HLA-Kopplungsgruppe auf C₆

In letzter Zeit richtete sich die Aufmerksamkeit auch auf weitere, auf dem Chromosom Nr.6 genetisch determinierte Polymorphismen:

1)5)1) MLC

Im Rahmen von Untersuchungen der zellulären Immunvorgänge bei der Transplantatabstoßung wurde mit der "Gemischten Leukozytenkultur", MLC (= Mixed Leucocyte Culture), ein in-vitro-Modell der Antigenerkennung eingeführt. Im Prinzip beruht der MLC-Test darauf, daß Lymphozyten in vitro durch gewisse Zelloberflächenantigene zur Transformation angeregt werden können, was als Lymphozytenstimulierung bezeichnet wird. A m o s (16) und B a c h (16) zeigten 1968 mittels Familienanalysen, daß sich die Stimulation für die MLC ebenfalls auf dem C₆-Chromosom befindet. Es gilt inzwischen als erwiesen, daß HLA-System und MLC von getrennten, eng gekoppelten Loci genetisch determiniert werden (Y u n i s et al. 1971 (98); E i j s v o o g e l et al. 1972 (42); M e m p e l et al. 1972a, 1972b, 1973 (58)). Man nennt den MLC-Lokus HLA-D. Er weist Allelie auf.

1)5)2) PGM₃

1972 erkannten L a m m et al. (51), daß die Ausprägung des Enzyms Phosphoglucomutase 3, kurz PGM₃, von einem Genort auf dem Chromosom Nr.6 gesteuert wird. Der PGM₃ -Genort ist in einer Entfernung von ca. 15-20 Rekombinationseinheiten auf der Seite des HLA-B-Genortes lokalisiert.

1)5)3) Bf-System

A l l e n (13) gelang es 1974, für den Polymorphismus des C3-Proaktivators (Properdinsystem oder Properdinfaktor B = Bf-System) gleichfalls Kopplung mit dem HLA-System zu beweisen. Die genaue Lokalisation war 1975 R i t t n e r et al. (75) vorbehalten. Bf selbst ist ein polymorphes Protein, das 1959 von P i l l e m e r (69) entdeckt wurde und den Serumglobulinen zuzurechnen ist. Es spielt bei der Aktivierung des Komplementsystems eine wichtige Rolle.

1)5)4) GLO

Von M a y r et al. 1975 (54) wurde gezeigt, daß der Polymorphismus der Glyoxalase (GLO), ein Enzym, das Methylglyoxal in Lactat überführt und somit im Aminosäurestoffwechsel eine Rolle spielt, mit HLA gekoppelt ist. Der Genort konnte in einer Entfernung von ca. 5 Rekombinationseinheiten vom HLA-B-Genort entfernt auf der Seite von HLA-D lokalisiert werden. (W e i t k a m p 1976 (97); P r e t o r i u s et al. 1976 (70))

1)5)5) Komplement-Komponenten

Es konnte gezeigt werden, daß die Komplement-Komponenten C2 und C4 ebenfalls mit HLA gekoppelt sind; eine Lokalisation war jedoch bisher nicht möglich. (F u et al. 1975 (44); R i t t n e r et al. 1975 (75))

Damit besteht die HLA-Kopplungsgruppe zur Zeit aus folgenden Parametern:

HLA-A - HLA-C - HLA-B - Bf - HLA-D - GLO - PGM₃

2) METHODIK

Die ersten entscheidenden Ergebnisse auf dem Gebiet der Leukozytenserologie erzielten D a u s s e t (34,35,37), van R o o d (77,78) und P a y n e (66) mit dem Leukozytenagglutinationstest. Seitdem fanden auf diesem Gebiet viele verschiedene Testmethoden Anwendung.

Die Anforderungen an einen Test lauten: Einfachheit der Durchführung, gute Reproduzierbarkeit und geringer Verbrauch an Testserum. In der Praxis blieben nur wenige Methoden übrig, die diesen Anforderungen gerecht wurden.

Obwohl die HLA-Antigene auf allen kernhaltigen Körperzellen zu finden sind, werden für ihren Nachweis aufgrund der relativ leichten Zugänglichkeit Blutzellen, also Granulozyten, Lymphozyten und Thrombozyten bevorzugt.

2)1) Seren

Antisera werden vor allem von Schwangeren, Primi- und Multiparae gewonnen. Diese bilden gewöhnlich Antikörper gegen die HLA-Antigene ihrer Kinder, welche diese vom Vater geerbt haben. Letztere werden in den Kreislauf der Mutter eingeschwemmt. Gegen diese kindlichen Zellen sind die oben erwähnten mütterlichen Antikörper gerichtet.

Von Personen, die mit HLA-Antigenen immunisiert wurden, lassen sich ebenfalls spezifische Antikörper gewinnen. Dieses Verfahren findet jedoch selten Anwendung. Häufig sind die gewonnenen Antisera multispezifisch. Das Serum enthält dann Antikörper gegen verschiedene HLA-Antigene. Diese Sera sind für die HLA-Testung ungeeignet, es sei

denn, daß mittels Teilspezifitäten die überzähligen Antikörperspezifitäten entfernt werden und man auf diese Weise ein operationell monospezifisches Antiserum erhält.

Das Problem der Multispezifität tritt auch bei Empfängern von Bluttransfusionen auf, besonders, wenn diese schon mehrfach transfundiert wurden und somit Antikörper gegen mehrere verschiedene HLA-Antigene besitzen.

Für die Herstellung von HLA-Antisera in größerem Umfang verwendet man heute meist Sera von Frauen, die durch mindestens eine Schwangerschaft immunisiert wurden, also Primi- oder Multiparae. Zum Zeitpunkt der Entbindung und evtl. einige Wochen danach finden sich in 15-20% der Sera lymphozytotoxische Antikörper. Nur etwa 10% davon eignen sich allerdings für eine Verwendung als HLA-Typisierungssera. Die übrigen enthalten Antikörper, die nicht mit HLA-Spezifitäten korrelieren, oder gegen mehrere Antigene gerichtet sind.

Die auf diese Art an monospezifischem HLA-Antiserum zu gewinnende Menge wird ausserdem dadurch begrenzt, daß zwei Antisera, die gegen dasselbe Antigen gerichtet sind, so gut wie niemals vollständig in ihrer Reaktivität übereinstimmen. Aus diesem Grund müssen zur Definition eines Antigens mindestens zwei bis drei Sera der gleichen Spezifität verwendet werden. Wegen der Seltenheit guter Antisera kommen für die HLA-Typisierung in größerem Maßstab nur Mikromethoden in Frage.

Zur Bestimmung der Spezifität der einzelnen Antisera gibt es mehrere Verfahren: Einmal die Vergleichsanalyse. Bei ihr erfolgt die Charakterisierung des HLA-Serums durch Testung eines Panels von Lymphozyten mit bekannten Antigenen. Dieses Verfahren ist heute allgemein gebräuchlich.

Es ist auch möglich, mittels Absorption die Spezifität der Antiseren zu testen. Kreuzreaktionen sind hierbei besonders zu berücksichtigen.

Schließlich besteht theoretisch auch die Möglichkeit, obiges Ziel mittels Familienuntersuchungen zu erreichen. Wegen ihrer Aufwendigkeit hat diese Methode jedoch keine praktische Bedeutung.

2)2) Testmethoden der Gewebetypisierung

Zur Gewebetypisierung werden heute fast ausschließlich Blutzellen verwendet. Vier verschiedene Methoden haben sich als zweckmäßig erwiesen. Drei von ihnen dienen dem Nachweis von HLA-A, B, C-Antigenen, während mit Hilfe der MLC (Mixed Leucocyte Culture) die Allele des HLA-D-Genortes getestet werden.

2)2)1) LAT

Der Leukozytenagglutinationstest, LAT, war der erste Test, mit Hilfe dessen entscheidende Ergebnisse auf dem Gebiet der Leukozytenserologie erzielt werden konnten. (D a u s s e t (34, 35, 37), v a n R o o d (77, 78), P a y n e (66) Davon wurden im Laufe der Zeit eine ganze Reihe von Variationen erprobt. Heute wird er folgendermaßen ausgeführt:

Eine Leukozytensuspension, hauptsächlich bestehend aus Lymphozyten und Granulozyten, wird mit agglutinierenden Antisera inkubiert. Jedem Antiserum wird also eine gewisse Menge der zu bestimmenden Leukozytensuspension beigegeben. Eine eventuelle Agglutination der Zellen wird mit Farbstoff, zum Beispiel Toluidinblau, sichtbar

gemacht. Fällt die Reaktion mit einem der Antisera positiv aus, sichtbar an der Färbung, so zeigt dies das Vorliegen des homologen Antigens an.

Ein Nachteil der beschriebenen Methode ist die begrenzte Reproduzierbarkeit. Weiterhin muß der Test am Tag der Blutabnahme durchgeführt werden, da die Granulozyten sehr schnell absterben und dann spontan verklumpen. Die Reaktionen müssen darüber hinaus sofort nach Beendigung des Tests abgelesen werden, da es sonst zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann.

2)2)2) Thrombozyten-KBR

Neben dem noch zu beschreibenden Lymphozytotoxizitätstest hat sich die Thrombozyten-Komplementbindungsreaktion (= Thrombozyten-KBR) als zweite Routinemethode in den meisten Labors durchgesetzt (von S h u l m a n (80) ausgearbeitet, von S v e j g a a r d (86,87), C o l o m b a n i (30,31) und D' A m a r o (33) vervollkommen).

Eine Suspension von Thrombozyten reagiert mit ihren korrespondierenden, komplementbindenden Antikörpern. Dabei wird Komplement verbraucht. Dieser Verbrauch wird mittels eines hämolytischen Indikatorsystems wie folgt gemessen: Findet Hämolyse statt, so erfolgte keine Bindung des Komplements, der Test war also negativ. Umgekehrt zeigt ein Ausbleiben der Hämolyse eine Komplementbindung und somit eine positive Reaktion an.

Schwierigkeiten bereitet bei der KBR die Beschaffung von geeigneten Antisera. Die Testempfindlichkeit der KBR ist nämlich fünfzehnmal geringer als die des LCT. Es müssen deshalb sehr viel mehr Seren durchgetestet werden, um gute Antikörper zu finden. Der große Vorteil

der Methode besteht darin, daß das Antigen, also die Thrombozyten, monatelang bei + 4° C im Kühlschrank gelagert werden können. Ausserdem ist es möglich, das Ergebnis photoelektrisch ablesen zu lassen. Es wird dann zur Analyse an einen Rechner weitergegeben, was den Test sehr gut reproduzierbar macht.

2)2)3) LCT

Nach der Einführung des Mikrolymphozytotoxizitätstests, LCT, durch T e r a s a k i (92) und Mc C l e l l a n d (92) 1964 entwickelte sich diese Methode zu einem sehr brauchbaren Testverfahren. Sie wird heute in verschiedenen Variationen in den meisten Gewebetypisierungs-labors angewandt.

Im Prinzip werden dabei Lymphozyten, zytotoxisches Antiserum (von Schwangeren gewonnen) sowie Komplement zusammengegeben. Die Antikörper des Antiserums reagieren unter Komplementverbrauch mit "ihrem" HLA-Antigen auf der Lymphozytenmembran. Durch diese Reaktion wird die physiologische Schrankenfunktion der Zellmembran zerstört. Die solcherart durch die Antigen-Antikörperreaktion geschädigten Lymphozyten nehmen daher durch ihre defekte Membran Farbstoff auf, während die intakten vitalen Zellen vor Anfärbung geschützt sind. Die folgende, von T e r a s a k i (92) eingeführte Technik wurde vom amerikanischen "National Institute of Health" als Standardmethode anerkannt; deshalb auch die Bezeichnung "NIH-Technik". Sämtliche, für diese Studie untersuchten Familien wurden nach dieser Methode HLA-typisiert.

Wichtig für die Ausführung des Tests selbst sind die Mikrotestplatten, der sogenannte "Terasaki-Tray". Jeder Tray hat 60 Vertiefungen, in die zunächst dickflüssiges

Paraffinöl eingebracht wird. Jede der Vertiefungen ist für ein einziges spezifisches, gegen ein bestimmtes HLA-Antigen gerichtetes Antiserum bestimmt. Je ein Mikroliter einer jeden Antiserum-Spezifität wird in je eine der Aussparungen unter das Paraffinöl gespritzt. Die solcherart vorbereiteten Platten können bei -80°C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt werden.

Bei allen Formen des Lymphozytotoxizitätstests stellt sich das Problem der Herstellung einer möglichst reinen Lymphozytensuspension. Letztere ist für die exakte Durchführung des Tests von großer Bedeutung. Allgemein üblich ist heute die von Boyum (23) eingeführte Zentrifugation mit Ficoll-Isopaque. Sie ermöglicht die Herstellung von etwa 95%ig reinen Lymphozytensuspensionen und wurde auch für die Gewinnung der Lymphozyten der in dieser Studie untersuchten Personen benutzt: 10 ml heparinisiertes Venenblut des zu testenden Probanden werden mit 0,9%iger Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 3 verdünnt. Damit wird eine Ficoll-Isopaque-Lösung überschichtet und das Ganze zehn Minuten zentrifugiert. Der dabei entstehende Zellring setzt sich aus Lymphozyten zusammen und ist mit bloßem Auge gut gegen die übrige Lösung abgrenzbar. Er wird abpipettiert und zweimal zehn Minuten mit Hank'scher Lösung zentrifugiert, also gewaschen. Die Zellen stellt man anschließend auf 2000 pro Milliliter ein.

Auf diese Weise gewonnene Lymphozytensuspensionen werden entweder sofort nach einer der oben beschriebenen Methoden weiterverarbeitet oder mit Dimethylsulfoxid (DMSO) in flüssigem Stickstoff bei -80°C für den späteren Gebrauch eingefroren.

Von der Lymphozytensuspension einer zu typisierenden Person wird je ein Mikroliter als Antigen zu jedem Antiserum zugegeben. Die Suspension sollte möglichst

rein sein. Die so präparierten Platten werden für 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Das Paraffinöl schützt das Antigen-Antikörpermischung dabei vor Verdunstung.

Nach dieser ersten Inkubation werden je fünf Mikroliter frischen, unverdünnten Kaninchenserums als Komplement zugesetzt. Es folgt eine zweite Inkubation, diesmal eine Stunde lang, bei Zimmertemperatur. Aus den Mengenverhältnissen ist ersichtlich, daß die Reaktion in einem mehrfachen Komplementüberschuß stattfindet. Eine etwaige Antikomplementarität der Testseren wird dabei ausgeschaltet.

Es folgt eine Färbung mit fünfprozentiger Eosinlösung und eine daran anschließende Fixierung mit Formaldehyd. Zur Anfärbung wird manchmal Trypanblau statt Eosin verwendet. Der Formaldehyd hat die Aufgabe, die Anfärbung der durch die Komplementreaktion geschädigten und somit positiven Zellen zu stoppen. Damit wird auch noch nach Wochen eine einwandfreie Ablesung des Testergebnisses gewährleistet.

Nach Abdeckung der Testplatte mit einem Objektträger wird unter dem Phasenkontrastmikroskop abgelesen. Noch lebende Lymphozyten leuchten dabei als kleine helle Kugeln auf, während die lysierten, dunkel gefärbten Zellen als große Flecken im Hintergrund keinen Phasenkontrast geben.

Der Prozentsatz der lysierten Zellen wird geschätzt und aufgrund dieser Schätzung als positiv oder negativ gewertet. 10-20% lysierte Zellen gelten dabei als einmal positiv, 20-50% als zweifach, 50-70% als dreifach und 75-100% als vierfach positiv.

Man nennt den eben beschriebenen Test auch "Zweistufentest", da zunächst nur Lymphozyten mit dem Antiserum inkubiert werden und erst danach das Komplement zugegeben wird.

Im Gegensatz dazu wird eine Variation dieses Tests nach K i s s m e y e r - N i e l s e n (49), als "Einstufentest" bezeichnet. Die Lymphozyten werden hierbei sofort in einer Mischung aus Human- und Kaninchenkomplement suspendiert und mit Antiserum inkubiert. Anschließend gibt man dazu den Farbstoff Trypanblau. Es folgt eine erneute Inkubation. Ausgewertet wird durch Auszählung der blaugefärbten Zellen im Mikroskop.

Die Kismeyer-Nielsen-Methode zeichnet sich durch ihre nur dreißig Minuten dauernde Inkubationszeit aus. Dies geht allerdings zu Lasten der Empfindlichkeit des Tests. Ein weiterer Nachteil besteht in der schlechteren Fixierbarkeit der mit Trypanblau gefärbten Lymphozyten.

Eine weitere Variation des Lymphozytotoxizitätstests ist die von T o s i (94) und B o d m e r (20) eingeführte Fluorochromasie. Diesem Test liegt die Erfahrung zugrunde, daß lebende Zellen nicht fluoreszieren - des Fluoreszeinazetat aufnehmen und mittels zelleigener Esterasen in fluoreszierendes Fluoreszein umwandeln. Toten oder geschädigten Zellen ist diese Umwandlung nicht möglich. Die Unterscheidung zwischen lebenden, also fluoreszierenden, und toten, nicht fluoreszierenden Lymphozyten gelingt mit dem Fluoreszenzmikroskop. Selbst Zellsuspensionen, die nur noch 30% lebende Zellen enthalten, können mit dieser Methode getestet werden.

2)3) MLC

Eine weitere Methode der Gewebetypisierung ist die "Gemischte Leukozytenkultur", kurz MLC (Mixed Lymphocyte Culture) genannt. Der MLC-Test ist sozusagen ein "in-vitro"-Modell der Antigenerkennung bei der Transplantatabstoßung. (A l b e r t i n i ; B a c h (12))

Er läßt sich auf folgendes Prinzip zurückführen: Lymphozyten können in vitro durch bestimmte Stoffe, zum Beispiel Hämagglutinine, oder durch andere antigene Reize zur Transformation angeregt werden. Diese Blastentransformation führt zu einer erhöhten DNS-Synthese, die am Einbau von radioaktivem H^3 -Thymidin gemessen wird.

Für den MLC-Test werden Lymphozyten von potentiellen Spendern und Empfängern eines Transplantats gemeinsam in vitro kultiviert, nachdem vorher eine der beiden Zellpopulationen durch ein Mitosegift (zum Beispiel Mitomycin C) in ihrer Teilungsaktivität gehemmt worden war. Gewertet wird die Reaktion der noch vermehrungsfähigen, also unbehandelten Zellen auf den Antigenreiz der gehemmten Population. Die Stärke der Reaktion ist dabei proportional der genetischen Verschiedenheit der beiden untersuchten Individuen.

2)4) Bf

In Zusammenarbeit mit Dr. R i t t n e r (74) wurde ein Teil der vorliegenden 191 Familien auch auf den "Properdinfaktor B", kurz Bf genannt, untersucht (13, 69, 75). Auf die Genetik des Bf-Systems wird in einem späteren Kapitel eingegangen (Kap. 3)9)2)). Bestimmt werden die Bf-Phänotypen mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese auf Agar-Platten, wie 1970 von T e i s b e r g (90) beschrieben:

Nach dreistündiger Wanderung in dem gut gekühlten Agar-Gel unter einer Spannung von 20 V/cm werden die Proteinfächer mit spezifischem Anti-Bf-Serum inkubiert und so fixiert: Man saugt dazu das Antiserum mit einem Streifen Filterpapier auf und legt diesen auf die Region der

Platte, in der nach drei Stunden Laufzeit die Bf-Fraktion zu erwarten ist. Die anschließende, drei- bis vierstündige Inkubation wird bei 37°C durchgeführt. Um nicht fixiertes Protein zu entfernen, werden die Platten über Nacht in eine Salzlösung gelegt. Danach wäscht man sie fünf Minuten mit normalem Wasser und läßt sie trocknen. Die Anfärbung erfolgt mit Amidoschwarz.

2)5) PGM₃

Eine Anzahl der vorliegenden Familien wurde von G. P r e t o r i u s (71) für die Phosphoglucomutase 3, PGM₃ genannt, typisiert. Man unterscheidet bei diesem Enzym nach dem bisherigen Stand der Untersuchungstechnik zwischen PGM₃-1 und PGM₃-2. Die Genetik der Phosphoglucomutase wird an anderer Stelle behandelt (Kap.3)9)3)).

Während zur Bestimmung von PGM₁ und PGM₂ menschliche Erythrozyten benötigt werden, wird PGM₃ mit Hilfe von Leukozyten bestimmt. Die Proteinfractionen werden mittels Stärkegel-Elektrophorese getrennt (S p e n c e r et al. (82)). Das Stärkegel besteht aus Kartoffelstärke und Gelpuffer. Ein zusätzlicher Elektrolytpuffer ist notwendig. Dieser wird durch Filterpapier (Whatman No.17) mit dem Stärkegel in der Elektrophoresekammer verbunden. Die Spannung beträgt 6 V/cm.

Zur Herstellung der Leukozytensuspension verwendet man ACD-Blut des Probanden. Es wird im Verhältnis 2 : 1 mit Neoplasma gel gemischt. Nach der Sedimentation der Erythrozyten wird der Überstand abpipettiert, mit NaCl gemischt und zentrifugiert. Der bei der Zentrifugation erhaltene Überstand wird abpipettiert und verworfen. Ein hämolytischer Puffer zerstört die verbliebenen Erythrozyten und verhindert damit eine Verfälschung des

Ergebnisse durch PGM₁ und PGM₂. Es folgt eine Inkubation mit anschließender nochmaliger Zentrifugation. Der aus zerstörten Erythrozyten bestehende Überstand wird abgesaugt. Der verbleibende Teil, die Leukozyten, wird bei -20°C eingefroren und so für die spätere Weiterverarbeitung konserviert.

Beim Auftauen erreicht man durch Zugabe von Aqua dest. eine Zerstörung der Leukozytenzellmembranen und somit eine Freisetzung der zellulären Enzyme. Weitere Zerstörung gelingt mit Ultraschall. Nach Zentrifugation wird das Filterpapier der Elektrophoresekammern mit dem Überstand obigen Prozesses getränkt. Die Laufzeit beträgt 17 Stunden. Gute Kühlung ist dabei wesentlich. Das Gel wird nun horizontal halbiert, um die durchschnittliche Laufgeschwindigkeit zu erfassen, da die Fraktionen oben schneller, unten langsamer wandern. Angefärbt wird mit einer Enzymmischung nach S p e n c e r et al. (82). Die Ablesung und fotografische Dokumentation der gefärbten Proteinbänder erfolgt nach einer weiteren Inkubation.

2)6) Materialbeschaffung (Familien)

Die untersuchten Familien stammen aus der Umgebung von München und vor allem aus München selbst. Auf die Auswahl möglichst kinderreicher Familien (drei Kinder und mehr) wurde dabei besonderer Wert gelegt. Für die Mehrzahl der Familien wurde der Kontakt durch Inserate in mehreren Münchner Regionalzeitungen hergestellt.

3) EINFÜHRUNG IN DIE HLA-GENETIK

3)1) Bedeutung als Transplantationsantigene

Bedeutung besitzen die HLA-Antigene heute unter anderem für die Transplantation, da die Hauptinformation für die Fremderkennung im HLA-System liegt. Die meisten Erfahrungen diesbezüglich wurden bei Nierentransplantationen gesammelt (61; 40; 48; 63; 84; 40; 48;). Bei Eurotransplant beispielsweise werden die Spender routinemäßig nach HLA-Kriterien ausgesucht. Es konnte dabei eindeutig die Beziehung zwischen klinischem Erfolg und Kompatibilität der HLA-Antigene von Spender und Empfänger nachgewiesen werden.

3)2) Drei Genorte mit multiplen Allelen

Der Haplotyp als Vererbungseinheit

Die Histokompatibilitätsantigene gehören zum Haupt-histokompatibilitätskomplex ("Major Histocompatibility Complex" MHC) und werden mit den oben beschriebenen serologischen Methoden definiert. Diese Gewebean-tigene sind beim Menschen auf drei Genorten des Chromosoms Nr.6 codiert. Sie werden als A, B und C bezeichnet und sind auf dem Chromosom in der Reihenfolge A-C-B angeordnet. Locus C ist dabei von untergeordneter Bedeutung. Er liegt in sehr enger Nachbarschaft von B. Die Entfernung zwischen A und B wurde zu etwa 0,85% Rekombinationsfrequenz berechnet (S t a u b - N i e l s e n (83)). Im folgenden werden nur die beiden wichtigsten HLA-Genorte, Locus A und B, betrachtet. Für Locus C gelten jedoch in Bezug auf Vererbungsmodus und Allelie die

gleichen Aussagen wie für die beiden anderen Loci. Da die HLA-Loci auf ein und demselben Chromosom liegen, kann die Vererbung der HLA-Antigene nur gekoppelt erfolgen. Diese Paare von gekoppelt vererbten Antigenen stellen die eigentliche Vererbungseinheit des HLA-Systems dar und werden als Haplotypen bezeichnet. Jedes Individuum besitzt entsprechend den diploiden Autosomen zwei Haplotypen mit jeweils zwei HLA-Antigenen, also nie mehr als vier verschiedene HLA-Antigene (bei Berücksichtigung des Locus C demnach sechs verschiedene Antigene). Entsprechend den beiden Loci A und B existieren zwei Serien von Antigenen, die sich untereinander wie Allele verhalten. Das bedeutet, daß zwei Antigene der gleichen Serie niemals gemeinsam auf einem Chromosom und somit auf einem Haplotyp gefunden werden.

Wie 1970 durch Nachweis eines Crossing overs (Bodmer et al. (21)) bewiesen werden konnte, sind die einzelnen Genorte durch Rekombination voneinander trennbar. Die multiple Allelie an drei gekoppelten Genorten ergibt für das HLA-System einen ausgeprägten Polymorphismus, der über eine Million verschiedener Genotypen bedingt. Die vorliegende Arbeit geht von den bis 1974 bekannten HLA-Spezifitäten aus.

3)3) Vererbung

Wie die meisten serologisch erkennbaren Marker werden die HLA-Antigene als codominante Merkmale vererbt. Bezeichnet man die elterlichen Vererbungseinheiten, also die Haplotypen, mit a und b (Vater) sowie c und d (Mutter), so sind vier verschiedene Segregationsmuster möglich, nämlich a/c, a/d, b/c, b/d.

Ein Beispiel:

Haplotypen des Vaters: a : HLA-A1 - B8
 b : HLA-A3 - B7

Haplotypen der Mutter: c : HLA-A2 - B12
 d : HLA-A9 - B5

Daraus lassen sich die möglichen Haplotypen des Kindes bestimmen:

	Vater		Mutter	
	a	b	c	d
	/		/	
Kinder:	a/c	a/d	b/c	b/d
	<u>A1 - B8</u>	<u>A1 - B8</u>	<u>A3 - B7</u>	<u>A3 - B7</u>
	A2 - B12	A9 - B5	A2 - B12	A9 - B5

3)4) Bestimmung des Genotyps beim Vorliegen von serologisch nicht zu definierenden oder unbekannten Antigenen

Bei manchen Individuen finden sich jedoch nur drei oder gar nur zwei serologisch definierbare Antigene. Es handelt sich hier entweder um Homozygotie für ein bereits bekanntes Merkmal (zum Beispiel A1 - B8 / A1 - B7, phänotypisch als A1, B7, B8 in Erscheinung tretend), oder um das Vorliegen eines bisher noch unbekannten Antigens. Letzteres wird als "x" oder "blank" bezeichnet. Bei Einzelpersonen kann zwischen beiden Möglichkeiten nur durch eine Wahrscheinlichkeitsrechnung unterschieden werden (A l b e r t (7)).

Ist es dagegen möglich, Nachkommen der betreffenden Person zu typisieren, so gelingt es meist, eine der beiden Möglichkeiten auszuschließen. Ein Beispiel soll dies verdeutlichen:

Bei dem serologisch bestimmten Phänotyp A1, B7, B8 einer Person soll entschieden werden, ob es sich um Homozygotie für das Antigen HLA-A1 oder um ein unbekanntes Antigen "x" handelt. Bei einem Kind dieser Person erbrachte die serologische Untersuchung neben den beiden, vom anderen Elternteil geerbten Antigenen, die Typen A1 und B7. A1 und B7 wurden somit gekoppelt vererbt, bilden also einen der beiden Haplotypen des obigen Individuums. Bei dem zweiten Kind fand man unter anderem A1 und B8, was dem zweiten Haplotyp entspricht. Damit ist eine Homozygotie für HLA-A1 erwiesen. Der daraus abgeleitete Genotyp ist daher A1-B7/A1-B8.

Grundsätzlich ist von Einzelpersonen nur der Phänotyp bestimmbar. Auf den Genotyp, die Kombination der vier HLA-Antigene, läßt sich, wie oben, durch eine Segregationsanalyse schließen. Diese setzt eine Familienuntersuchung voraus. Bei dem Phänotyp A1, A3, B7, B8 zum Beispiel bestehen zwei mögliche Genotypen: A1 - B7 / A3 - B8 und A1 - B8 / A3 - B7.

3)5) Kopplungsungleichgewicht

Manche HLA-A,-B-Genkombinationen, also Haplotypen, werden sehr häufig gefunden, andere wiederum sind selten. Das Maß für die Häufigkeit, die erwartete Haplotypfrequenz, ergibt sich aus dem Produkt der Genfrequenzen. Voraussetzung dafür ist ein Crossing-over-Gleichgewicht zwischen den beiden im Haplotyp gekoppelten Antigenen. Bei manchen häufigen Haplotypen fällt auf, daß die

Frequenzen der beteiligten Antigene für sich gar nicht hoch genug sind, um eine derartige Häufigkeit des resultierenden Haplotyps zu erklären. Dieses Phänomen beruht auf einer Störung des Kopplungsungleichgewichts (= linkage equilibrium). Die Differenz zwischen beobachteter und erwarteter Haplotypfrequenz ist ein Maß für obiges Kopplungsungleichgewicht (= linkage disequilibrium) (A l b e r t (7)). Für manche Haplotypen, zum Beispiel A1 - B8, ist dieses Ungleichgewicht in der weißen Bevölkerung charakteristisch hoch.

3)6) Familienanalyse

Um weitere Aufschlüsse über das Histkompatibilitätssystem zu erhalten, sowie neue HLA-Antigene zu entdecken, ist die serologische Untersuchung einer möglichst großen Anzahl von Individuen erforderlich. Wertvoller als die Typisierung von Einzelpersonen ist die Untersuchung von ganzen Familien. Neben der bereits erwähnten Segregationsanalyse zur Bestimmung des Genotyps der Eltern erlaubt sie Rückschlüsse auf den Vererbungsmodus und eventuelle Rekombinationen.

3)7) Serologie

Für die serologische Definition der Histokompatibilitätsantigene sind spezifische Antiseren erforderlich. Diese werden durch großangelegte Screening-Programme von Schwangerenserum ausgewählt. Näheres hierzu wurde eingangs erwähnt. Wegen der Multispezifität vieler dieser Seren ist eine strenge Auswahl erforderlich.

3)8) Rekombinationen

Die Annahme, daß die HLA-Antigene von zwei eng benachbarten Genorten eines Chromosoms determiniert werden, läßt Rekombinationen möglich erscheinen: Da die beiden Loci des HLA-Systems trotz ihrer engen Kopplung eine gewisse Strecke voneinander entfernt sind, müssen in einem bestimmten Prozentsatz aller Meiosen Chromosomenbrüche zwischen den Loci auftreten. Bei der anschließenden Wiederverschmelzung der beiden Bruchstücke der homologen Chromosomen können erstere vertauscht werden. Dieser Vorgang des Crossing over zwischen zwei benachbarten Genorten findet mit einer Häufigkeit statt, die wie man annimmt, der Entfernung zwischen den beiden Loci ungefähr proportional ist. Mit dem Nachweis eines Crossing over gelang es ja auch, die Existenz zweier getrennter HLA-Loci zu beweisen (B o d m e r et al. 1970 (21)).

3)9) Weitere Marker auf dem Chromosom Nr.6

3)9)1) MLC

Neben den Transplantationsantigenen des humoralen Systems sind lymphozytendefinierte Zelloberflächenmerkmale bei der Transplantatreaktion von Bedeutung (E i j s v o o g e l (42)). Die Gemischte Leukozytenkultur (MLC) wird als das "in-Vitro-Modell" der Antigenerkennung betrachtet. Es ist heute erwiesen, daß ein vom HLA-System getrennter, aber eng mit diesem gekoppelter Genort (HLA-D), die lymphozytenstimulierenden Strukturen codiert (A m o s (16)). Die einzelnen Allele des HLA-D-Locus werden mit Hilfe von

homozygoten Referenzzellen in der MLC definiert, wobei eine zu testende heterozygote Lymphozytenprobe A/B mit der homozygoten Zelle A/A eine Einweg-Nichtstimulation aufweist (T h o r s b y und P i a z z a (93)). Eine A-positive Zelle ist nämlich nicht in der Lage, an einer A/A-homozygoten Zelle etwas Fremdes zu erkennen. Auf diese Weise ließ sich die Verteilung der HLA-D-Gene in einer Population sowie die Segregation derselben in Familien bestimmen. Untersuchungen von Rekombinantengaben Aufschluß über die Lage des HLA-D-Locus zum HLA-A,B-System: Die Entfernung zum Locus B des HLA-Systems beträgt etwa 1% Rekombinationsfrequenz (N e t z e l et al. (62)).

3)9)2) Bf

Im genetischen Bereich des Haupthistokompatibilitätskomplexes MHC liegt weiterhin die Codierung für den Polymorphismus des Properdinfaktors Bf oder C3-Pro-aktivators. Es handelt sich hierbei um eine Komponente des Komplementsystems, das in der Immunabwehr als Effektormechanismus eine wichtige Rolle spielt. Der Bf-Faktor aktiviert über einen C3-Aktivator die Komplementkomponente C3 (G ö t z e und M ü l l e r - E b e r h a r d (45)). Diese setzt einen Kaskadenmechanismus in Gang, der die Bildung von biologisch aktiven, entzündungsfördernden Spaltprodukten anregt (Z o l l i n g e r (99)). Der Bf-Locus liegt zwischen HLA-B und HLA-D, was durch Nachweis von Rekombinationen zwischen HLA-B und MLC in zwei Familien belegt werden konnte (Histocompatibility Testing 75). Vom C3-Pro-aktivator sind bisher vier verschiedene Allele bekannt: Bf-F, Bf-S und sehr viel seltener: Bf-F1, Bf-S1.

3)9)3) PGM₃

Ebenfalls auf dem Chromosom Nr.6 findet sich der Genort für den Polymorphismus des Enzyms Phosphoglucomutase 3, kurz PGM₃ genannt. Er liegt auf der Seite von HLA-D, jedoch deutlich von diesem entfernt (L a m m e t al. (51)). Bisher sind zwei elektrophoretisch unterscheidbare Varianten von PGM₃ bekannt: PGM₃-1 und PGM₃-2. Die Phosphoglucomutase katalysiert im Kohlenhydratstoffwechsel den Übergang von Glucose-1-Phosphat in Glucose-6-Phosphat. Als Zwischenprodukt tritt Glucose-1,6-Diphosphat auf.

4) ERGEBNISSE

191 Familien mit 382 Eltern wurden nach der von T e r a s a k i (92) angegebenen Mikrolymphocyto-toxizitätsmethode HLA-typisiert. Dazu kommen 679 Kinder, 342 davon männlichen und 337 weiblichen Geschlechts. Im folgenden eine Aufschlüsselung der Familien nach der Zahl der Kinder:

Anzahl der Familien mit:

1 Kind	:	3
2 Kinder	:	47
3 "	:	60
4 "	:	51
5 "	:	13
6 "	:	5
7 "	:	4
8 "	:	3
9 "	:	2
10 "	:	2
13 "	:	1
Gesamt	:	<u>191</u>

4)1) Phänotypen und Genotypen

Die Genotypen der Eltern ergaben sich aus der Segregationsanalyse ihrer Nachkommen und wurden zum Zwecke der Übersichtlichkeit, nach Anfangsbuchstaben geordnet, in einer Tabelle zusammengefaßt. Diese Genotypentabelle erwies sich für die nachfolgenden Phänotyp-, Gen- und Haplotypfrequenzbestimmungen als sehr hilfreich.

4)1)1) Berechnung unklarer Haplotypen aus den
Phänotypdaten (Maximum Likelihood-Methode)

Bei der Zählung der Haplotypen für die Haplotypfrequenz ergaben sich in manchen Fällen Schwierigkeiten, da in einer Reihe von Familien die Ableitung einiger Haplotypen nicht eindeutig ist. Dieselben Probleme treten natürlich in diesen Fällen auch für die Bestimmung der Genfrequenzen auf, die nur bei Kenntnis aller vier HLA-Antigene der Mitglieder der untersuchten Population sinnvoll ist. Unklare Genotypen müßten nämlich von der Zählung ausgeschlossen werden, was das Bild verfälschen würde. Deshalb ist es notwendig, bei Familien mit bekanntem Phänotyp, aber unklarem Genotyp die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen der aufgrund des Phänotyps in Frage kommenden Haplotypen zu berechnen: In einer Familie sei beispielsweise der Phänotyp der Mutter als HLA-A2,B7,B8 bestimmt worden. Aus der Segregationsanalyse der Antigene bei den Kindern ging nur hervor, daß ein mütterlicher Haplotyp A2 - B7 lautet. Hier bleibt es unklar, ob der zweite mütterliche Haplotyp HLA-S2 - B8 heißt, oder ob es sich statt A2 um ein unbekanntes Antigen des Locus A handelt, also x - B8. Die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines der beiden möglichen Haplotypen (A2 - B8 oder x - B8) wird aus bereits vorhandenen Schätzwerten für die Haplotypfrequenzen von A2 - B8 bzw. x - B8 errechnet. Diese Schätzwerte können aus Haplotypfrequenztabelle entnommen werden, die aus früheren Untersuchungen an sehr großen Populationen erarbeitet wurden. Die Summe der Wahrscheinlichkeiten ist dabei immer gleich 1. Für welchen Haplotyp die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens größer ist, hängt von den Frequenzen der beiden in Frage kommenden Antigenkombinationen ab. So ist zum Beispiel die Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen von HLA-A2 - B8 gleich:

$$p_{A2-B8} = \frac{h_{A2-B8}}{h_{A2-B8} + h_{x-B8}}$$

p steht dabei für die Wahrscheinlichkeit, h für die Haplotypfrequenz. Aufgrund obiger Feststellung ist p_{x-B8} gleich $1 - p_{A2-B8}$.

Gibt es mehr als zwei Möglichkeiten für die Ausprägung eines Haplotyps, so werden die entsprechenden Haplotypfrequenzen im Nenner obiger Formel dazuaddiert, zum Beispiel:

$$p_{A2-B8} = \frac{h_{A2-B8}}{h_{A2-B8} + h_{x-B8} + h_{x-y}}$$

Die beschriebene Berechnung der unklaren Haplotypen wird auch als "Maximum Likelihood-Methode" bezeichnet. Bei der Bestimmung der jeweiligen Gen- oder Haplotypfrequenzen werden die so ermittelten Wahrscheinlichkeiten der betreffenden Gene bzw. Haplotypen den gezählten Werten zugerechnet und so die endgültigen Frequenzen festgestellt (nach A l b e r t (5)).

4)1)2) Bestimmung der Phänotyp- und Genfrequenzen

Zunächst wurden die Phänotypfrequenzen sämtlicher heute bekannten HLA-Antigene von Locus A und B ermittelt. Dies erfolgte mittels Auszählung in der Weise, daß sämtliche 382 Eltern auf das Vorkommen des jeweiligen HLA-Antigens untersucht wurden. Man teilt die Zahl der für das untersuchte Antigen positiven Personen durch die Gesamtzahl der vorhandenen Individuen und erhält so die Frequenz des Antigens:

$$f = \frac{\text{Anz. d. gezählten Positiven}}{\text{Gesamtzahl d. Eltern (N)}}$$

Die genaueste Methode zur Bestimmung der Genfrequenz von HLA-Antigenen ist, wie oben, die Auszählung aus den in der Familienanalyse festgestellten Genotypen:

$$g = \frac{\text{Anzahl d. gezählten Positiven}}{\text{Gesamtzahl d. Haplotypen (2N)}}$$

Eine weitere Möglichkeit der Ermittlung von Genfrequenzen eröffnet die von R a c e (72) für ABO - und ABO-ähnliche Systeme angegebene Formel. Sie erlaubt eine für unsere Zwecke ausreichend genaue Schätzung. Die Genfrequenz ist hier:

$g = 1 - \sqrt{1 - f}$, wobei f die Phänotypfrequenz des betreffenden Antigens, als Fraktion von 1 darstellt. Der zugehörige Standardfehler errechnet sich als:

$$SE = +/- \frac{\sqrt{C}}{2 N}$$

C ist dabei die absolute Anzahl der für das untersuchte Antigen positiven Personen.

4)1)2)1) Phänotypfrequenzen

In der vorliegenden Münchener Testgruppe dominiert in Bezug auf die Häufigkeit eindeutig das HLA-Antigen A2. Es besitzt eine Phänotypfrequenz von 0,5290. Dies steht in Einklang mit der Tatsache, daß A2 auch zuerst entdeckt wurde (D a u s s e t 1958 (35)). Bei Locus A folgen mit größerem Abstand A1 und A3 mit je 0,2840. Auch A9 mit 0,2200 fällt noch in diese Gruppe. Ausser diesen vier Antigenen liegt nur noch A10 über einer Frequenz von 0,1. Erwartungsgemäß sind die zuletzt entdeckten HLA-Antigene, also beispielsweise AW30, AW31 und Li am seltensten.

TABELLE 1

Phänotypfrequenzen (f) als Fraktion von 1
(N = 382 Eltern von 191 Familien)

L o c u s A

HLA-A	1	0,2840
HLA-A	2	0,5290
HLA-A	3	0,2840
HLA-A	9	0,2200
HLA-A	10	0,1020
HLA-A	11	0,0785
HLA-A	28	0,0628
HLA-A	29	0,0524
HLA-AW	30	0,0131
HLA-AW	31	0,0314
HLA-AW	32	0,0680
Li		0,0183
X		-

TABELLE 2

Phänotypfrequenzen (f) als Fraktion von 1
(N = 382 Eltern von 191 Familien)

L o c u s B

HLA-B	5	0,107
HLA-B	7	0,304
HLA-B	8	0,213
HLA-B	12	0,221
HLA-B	13	0,086
HLA-B	14	0,057
HLA-BW	17	0,073
HLA-B	27	0,094
HLA-BW	35	0,178
HLA-BW	40	0,097
HLA-BW	15	0,113
HLA-BW	16	0,052
HLA-B	18	0,071
HLA-BW	21	0,042
HLA-BW	22	0,055
HLA-BW	37	0,016
X		-

Die Schwankungsbreite liegt zwischen 0,5290 (A2) und 0,0131 (AW30). Eine Zusammenstellung der gefundenen Phänotypfrequenzen für Locus A findet sich in Tabelle 1, für Locus B in Tabelle 2.

Bei Locus B sind die Häufigkeiten der zugehörigen Antigene homogener verteilt. Sechs Antigene liegen in ihrer Frequenz über 0,1, am deutlichsten B7 mit 0,304, gefolgt von B12 mit 0,221, B8 mit 0,213 und BW35 mit 0,178. Sehr selten ist nur BW37. Die Schwankungsbreite liegt somit zwischen 0,304 (B7) und 0,016 (BW37). Eine gewisse Korrelation zwischen dem Zeitpunkt der Entdeckung und der Häufigkeit des Antigens ist auch bei Locus B zu beachten: R o o d (79) beschrieb 1962 das diallelische System 4a/b. Später stellte sich heraus, daß in der breiten Spezifität von 4a neben anderen die Antigene HLA-B5 und B12, in 4b B7 und B8 enthalten waren. B7, B8 und B12 haben auch die höchste Genfrequenz. Nur B5 liegt mit 0,107 niedriger als erwartet.

4)1)2)2) Genfrequenzen

Für die Genfrequenzen des Locus A ergibt der Vergleich zwischen Genzählung und -Berechnung aus den Phänotypdaten, wie aus Tabelle 3 und 4 ersichtlich, eine gute Übereinstimmung beider Methoden. Die errechneten Werte verstehen sich wieder als Fraktion von 1. Die Unterschiede liegen alle im Bereich des Standardfehlers und betragen bei den häufigeren Antigenen nicht mehr als 5%. Für die seltenen Antigene wäre zur exakten Aussage ein wesentlich größeres Untersuchungsmaterial als das hier vorliegende erforderlich. Die Frequenz von x entspricht der Frequenz aller bisher noch unentdeckten Antigene des Locus A. Sie ist mit 0,026 bzw. 0,063 (letzteres durch Genzählung ermittelt), das entspricht 6% aller Locus-A-

TABELLE 3

Genfrequenzen, bestimmt mittels
zweier verschiedener Methoden
(N = 382 Eltern von 191 Familien)

L o c u s A

Berechnet aus den Phänotypdaten $g = 1 - \sqrt{1 - f}$	Standard- fehler	Ermittelt durch Genzählung
--	---------------------	----------------------------------

HLA-A 1	0,156	$\pm$ 0,0136	0,148
HLA-A 2	0,316	$\pm$ 0,0186	0,304
HLA-A 3	0,156	$\pm$ 0,0141	0,153
HLA-A 9	0,118	$\pm$ 0,0120	0,112
HLA-A 10	0,055	$\pm$ 0,0082	0,055
HLA-A 11	0,042	$\pm$ 0,0072	0,040
HLA-A 28	0,034	$\pm$ 0,0064	0,032
HLA-A 29	0,027	$\pm$ 0,0058	0,026
HLA-AW 30	0,008	$\pm$ 0,0029	0,006
HLA-AW 31	0,018	$\pm$ 0,0045	0,016
HLA-AW 32	0,035	$\pm$ 0,0067	0,034
Li	0,009	$\pm$ 0,0037	0,009
X	0,026	-	0,063

TABELLE 4

Genfrequenzen, bestimmt mittels
zweier verschiedener Methoden
(N = 382 Eltern von 191 Familien)

L o c u s B

Berechnet aus den Phänotypdaten $g = 1 - \sqrt{1 - f}$	Standard- fehler	Ermittelt durch Genzählung
--	---------------------	----------------------------------

HLA-B	5	0,057	$\pm$ 0,0084	0,059
HLA-B	7	0,166	$\pm$ 0,0141	0,155
HLA-B	8	0,114	$\pm$ 0,0118	0,108
HLA-B	12	0,118	$\pm$ 0,0120	0,118
HLA-B	13	0,045	$\pm$ 0,0075	0,043
HLA-B	14	0,030	$\pm$ 0,0061	0,029
HLA-BW	17	0,038	$\pm$ 0,0069	0,038
HLA-B	27	0,050	$\pm$ 0,0078	0,050
HLA-BW	35	0,094	$\pm$ 0,0108	0,082
HLA-BW	40	0,051	$\pm$ 0,0080	0,049
HLA-BW	15	0,060	$\pm$ 0,0085	0,062
HLA-BW	16	0,028	$\pm$ 0,0058	0,028
HLA-B	18	0,039	$\pm$ 0,0068	0,037
HLA-BW	21	0,021	$\pm$ 0,0052	0,020
HLA-BW	22	0,029	$\pm$ 0,0060	0,028
HLA-BW	37	0,010	$\pm$ 0,0032	0,008
X		0,050	-	0,076

-Gene, sehr niedrig. HLA-A2 hat mit etwa 30% einen erwartungsgemäß hohen Anteil an der Gesamthäufigkeit. Die Schwankungsbreite erstreckt sich von 0,304 (HLA-A2) bis 0,006 (HLA-AW30). Sie entspricht damit relativ derjenigen der Phänotypfrequenzen. Die absoluten Frequenzwerte liegen bei den Phänotypen nahezu doppelt so hoch wie bei den Genotypen (z.B. $f(A1) = 0,284$; $g(A1) = 0,148$). Das liegt daran, daß in die Formel zur Berechnung der Phänotypfrequenzen im Nenner die Zahl der Eltern ($N = 382$), entsprechend bei den Genfrequenzen die Zahl der Chromosomen bzw. Haplotypen ($2N = 764$) eingeht. Letztere läßt den Nenner doppelt so groß werden, woraus eine Halbierung des Wertes für die Frequenz resultiert. Daß die Genfrequenz dennoch nicht genau halb so groß ist wie die Phänotypfrequenz, liegt an der Zahl der Homozygoten.

Bei Locus B stehen die Ergebnisse der beiden Methoden der Genfrequenzbestimmung ebenfalls in gutem Einklang. Lediglich bei BW35 resultiert eine Diskrepanz von etwa 12%. Für die Häufigkeit der B-Antigene gilt das bereits bei den Phänotypfrequenzen Gesagte. Auch hier nimmt BW35 mit einer auffallend hohen Genfrequenz von 0,082 eine Sonderstellung ein. Die Frequenzen schwanken zwischen 0,155 (B7) und 0,008 (BW37). Die Häufigkeit der bisher noch unentdeckten Antigene des Locus B liegt bei 6-7%. Eine Zusammenstellung sämtlicher Genfrequenzen wurde in Form der Tabellen 3 und 4 erarbeitet.

4)1)3) Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Bei zufallsbedingter Auswahl der Ehepartner, wie es bei den untersuchten Familien zu erwarten war, stellt sich in einer Bevölkerung für die Allele eines Locus ein Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ein. Als Beispiel seien

zwei Allele a und c genannt.

Die Anzahl der Heterozygoten beträgt dann:

$$H(a/c) = g_a \cdot 2 \cdot N \cdot g_c$$

g_a und g_c sind die Genfrequenzen der beteiligten Antigene, N entspricht der Probengröße, also der Anzahl der Familien. Diese Berechnung der Erwartungswerte geht somit von der Annahme aus, daß es sich um Allele eines einzigen Locus handelt. Eine Übereinstimmung mit den Beobachtungswerten würde diese Hypothese bestätigen.

Die Anzahl der Homozygoten errechnet sich nach der Formel:

$$H(a/a) = g_a^2 \cdot N$$

War es auch mit Hilfe der Segregationsanalyse nicht möglich, Hetero- bzw. Homozygotie klar zu bestimmen, so wurde dem doch bei der Ermittlung der Erwartungswerte folgendermaßen Rechnung getragen:

Für Individuen, die in Bezug auf ein Allel heterozygot (a/x) oder homozygot (a/a) sein können, muß gelten:

Der Erwartungswert für die Anzahl derartiger Individuen ist gleich der Summe der Erwartungswerte für Homozygote und Heterozygote mit bisher noch unbekanntem Antigen (x):

$$E(a/x) = g_a^2 \cdot N + g_a \cdot g_x \cdot 2 \cdot N$$

g_x ist die Genfrequenz aller bisher noch unbekannten Allele des Locus A bzw. B.

Die Erwartungswerte sämtlicher Allel-Kombinationen des Locus A und B wurden auf die angegebene Art und Weise berechnet. Zum anderen wurden die möglichen Konstellationen auch mittels Zählung auf ihre Häufigkeit geprüft. In Tabelle 5 und 6 finden sich die Ergebnisse der Zählung unter "Anzahl der beobachteten", die Erwartungswerte unter "Anzahl der erwarteten". Die Ergebnisse der beiden Methoden wurden mit Hilfe eines Chi-Quadrat-

-Tests miteinander verglichen:

$$\text{Chi-Quadrat} = \frac{(\text{beobachtet} - \text{erwartet})^2}{\text{erwartet}}$$

Allel-Kombinationen mit seltenen Antigenen sind natürlich auch selbst selten (z.B. AW30/AW31). Für solche Kombinationen ist ein Vergleich aufgrund der geringen Zahl der Positiven nicht repräsentativ. Die Chi-Quadrat-Werte wurden in diesen Fällen von der Summe der Frequenzen mehrerer seltener Allel-Kombinationen berechnet, da sich auf diese Weise Ungenauigkeiten gegenseitig ausgleichen können. In den Tabellen wurden die Heterozygoten, von denen ein gemeinsamer Chi-Quadrat-Wert bestimmt wurde, durch eine Klammer miteinander verbunden. Jedes HLA-Antigen ist mit allen anderen Allelen seines Locus kombiniert.

Um die Übereinstimmung von Beobachtungs- und Erwartungswerten ganzer Serien von Allelen (in diesem Fall die Serien von Locus A und B) zu untersuchen, werden die Chi-Quadrat-Werte der Einzelvergleiche addiert und ein Gesamt-Chi-Quadrat-Wert errechnet.

Für jeden Einzelvergleich steht ein Freiheitsgrad zur Verfügung. Die Gesamtzahl der Freiheitsgrade (v) erhält man aus der Anzahl der Vergleiche (n) und der Zahl der zur Berechnung der Erwartungswerte verwendeten Genfrequenzen (k) :

$$v = n - 1 - k$$

Für den Gesamt-Chi-Quadrat-Wert kann man aus der in Tabellen (z.B. Geigy-Tabellen) nachzulesenden Chi-Quadrat-Verteilung einen p -Wert bestimmen. Er ist ein Maß für die Übereinstimmung oder Anpassung zwischen den beobachteten und erwarteten Werten. Liegt der p -Wert höher als 0,1, so bedeutet das die Bestätigung der zugrunde gelegten Hypothese.

Die Kombination der Allele x und $A2$ war bei Locus A

TABELLE 5

Anpassungstest nach dem
Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
(N = 382 Eltern von 191 Familien)

Allele des L o c u s A

Art der Heterozygoten	Anzahl der beobachteten	Anzahl der erwarteten	Chi-Quadrat
X / X	0	1,53	1,530
X / HLA-A1	11	15,46	1,280
" / A2	48	49,97	0,075
" / A3	17	16,27	0,033
" / A9	9	10,20	0,141
" / A10	5	3,82	0,364
" / A11	3	2,52	0,091
" / A28	3	1,91	0,576
" / A29	0	1,49	
" / AW30	0	0,80	
" / AW31	0	0,88	
" / AW32	1	2,06	2,007
" / L1	0	0,50	
HLA-A1 / HLA-A2	40	34,38	0,918
" / A3	18	17,27	0,030
" / A9	13	12,68	0,008
" / A10	6	6,19	0,006
" / A11	4	4,51	0,057
" / A28	3	3,59	0,097
" / A29	1	2,90	0,372
" / AW30	3	0,69	
" / AW31	0	1,83	
" / AW32	8	3,82	
" / L1	1	0,99	3,650

TABELLE 5 (Fortsetzung)

Art der Heterozygoten	Anzahl der beobachteten	Anzahl der erwarteten	Chi-Quadrat
HLA-A2 / HLA-A3	36	35,53	0,006
" / A9	30	25,98	0,622
" / A10	10	12,76	0,597
" / A11	3	9,32	4,285
" / A28	9	7,41	0,300
" / A29	9	6,04	1,450
" / AW30	1	1,37	0,241
" / AW31	3	3,74	
" / AW32	9	7,87	0,162
" / L1	3	2,01	0,497
HLA-A3 / HLA-A9	9	13,01	1,236
" / A10	8	6,42	0,388
" / A11	11	4,66	8,625
" / A28	1	3,74	
" / A29	2	3,06	1,182
" / AW30	0	0,69	
" / AW31	3	1,83	
" / AW32	3	3,97	0,825
" / L1	0	1,07	
HLA-A9 / HLA-A10	3	4,74	0,638
" / A11	7	3,44	3,737
" / A28	4	2,75	
" / A29	3	2,22	
" / AW30	1	0,53	0,134
" / AW31	2	1,38	
" / AW32	2	2,90	

TABELLE 5 (Fortsetzung)

Art der Heterozygoten	Anzahl der beobachteten	Anzahl der erwarteten	Chi-Quadrat
HLA-A9 / L1	0	0,76	0,730
HLA-A10 / HLA-A11	0	1,68	
" / A28	1	1,38	
" / A29	2	1,07	
" / AW30	0	0,23	
" / AW31	2	0,69	
" / AW32	0	1,45	
" / L1	2	0,38	0,055
HLA-A11 / HLA-A28	0	0,99	0,232
" / A29	1	0,76	
" / AW30	0	0,15	
" / AW31	0	0,46	
" / AW32	0	1,07	
" / L1	0	0,30	
HLA-A28 / HLA-A29	1	0,61	
" / AW30	0	0,15	0,84
" / AW31	0	0,38	
" / AW32	2	0,84	

TABELLE 5 (Fortsetzung)

Art der Heterozygoten	Anzahl der beobachteten	Anzahl der erwarteten	Chi-Quadrat
HLA-A28 / Li	0	0,23	0,096
HLA-A29 / HLA-AW30	0	0,15	
" / AW31	1	0,30	
" / AW32	0	0,69	
" / Li	0	0,15	
HLA-AW30 / HLA-AW31	0	0,07	
" / AW32	0	0,15	
" / Li	0	0,07	
HLA-AW31 / HLA-AW32	1	0,38	
" / Li	0	0,07	
HLA-AW32 / Li	0	0,23	
Gesamt:	<u>382</u> ===	<u>382,00</u> =====	<u>37,273</u> =====

Gesamt-Chi-Quadrat: 37,273

Anzahl der Freiheitsgrade: 24

p = 0,055

TABELLE 6

Anpassungstest nach dem
Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
(N = 382 Eltern von 191 Familien)

Allele des L o c u s B

Art der Heterozygoten	Anzahl der beobachteten	Anzahl der erwarteten	Chi-Quadrat
X / X	1	2,22	0,142
X / HLA-B5	7	4,78	
" / B7	12	18,18	2,100
" / B8	8	10,73	0,694
" / B12	11	12,18	0,114
" / B13	3	3,21	0,111
" / B14	3	1,98	
" / BW17	1	2,75	
" / B27	0	3,86	
" / BW35	10	7,30	0,070
" / BW40	3	0,92	3,193
" / BW15	9	5,01	
" / BW16	3	1,91	0,390
" / B18	3	2,67	
" / BW21	0	1,22	
" / BW22	2	1,91	
" / BW37	2	0,50	
HLA-B5 / HLA-B7	7	6,95	0,005
" / B8	4	4,89	0,162
" / B12	5	5,35	0,023
" / B13	2	1,91	0,194
" / B14	1	1,30	
" / BW17	1	1,68	
" / B27	2	2,29	

TABELLE 6 (Fortsetzung)

Art der Heterozygoten	Anzahl der beobachteten	Anzahl der erwarteten	Chi-Quadrat
HLA-B5 / HLA-BW35	3	3,67	0,601
" / BW40	1	2,21	
" / BW15	3	2,83	0,564
" / BW16	0	1,30	
" / B18	1	1,68	2,870
" / BW21	1	0,92	
" / BW22	3	1,30	2,870
" / BW37	0	0,38	
HLA-B7 / HLA-B8	18	12,76	0,280
" / B12	12	13,98	
" / B13	6	5,12	0,138
" / B14	4	3,44	
" / BW17	5	4,51	0,698
" / B27	8	5,96	
" / BW35	7	9,70	0,751
" / BW40	10	5,80	
" / BW15	9	7,33	0,380
" / BW16	3	3,29	
" / B18	4	4,35	0,053
" / BW21	4	2,37	
" / BW22	4	3,29	0,306
" / BW37	0	0,92	
HLA-B8 / HLA-B12	11	9,70	0,174
" / B13	4	3,51	
" / B14	2	2,37	0,113
" / BW17	2	3,13	
" / B27	4	4,13	0,004
" / BW35	6	6,80	

TABELLE 6 (Fortsetzung)

Art der Heterozygoten	Anzahl der beobachteten	Anzahl der erwarteten	Chi-Quadrat
HLA-B8 / HLA-BW40	5	4,05	0,223
" / BW15	4	5,12	0,245
" / BW16	1	2,29	0,005
" / B18	3	3,06	
" / BW21	3	1,68	
" / BW22	6	2,29	
" / BW37	0	0,69	1,414
HLA-B12 / HLA-B13	4	3,90	0,179
" / B14	1	2,60	
" / BW17	4	3,44	
" / B27	4	4,51	
" / BW35	10	7,42	0,897
" / BW40	5	4,43	0,073
" / BW15	6	5,58	0,031
" / BW16	4	2,52	1,655
" / B18	5	3,36	
" / BW21	2	1,85	
" / BW22	1	2,52	
" / BW37	0	0,69	0,154
HLA-B13 / HLA-B14	2	0,92	0,096
" / BW17	3	1,22	
" / B27	0	1,68	
" / BW35	3	2,67	
" / BW40	2	1,60	

TABELLE 6 (Fortsetzung)

Art der Heterozygoten	Anzahl der beobachteten	Anzahl der erwarteten	Chi-Quadrat
HLA-B13 / HLA-BW15	2	2,06	1,200
" / BW16	0	0,91	
" / B18	1	1,22	
" / BW21	0	0,69	
" / BW22	0	0,92	
" / BW37	0	0,23	
HLA-B14 / HLA-BW17	1	0,84	0,076
" / B27	1	1,15	
" / BW35	2	1,83	
" / BW40	2	1,01	
" / BW15	1	1,37	
" / BW16	0	0,61	
" / B18	1	0,84	1,090
" / BW21	0	0,46	
" / BW22	0	0,61	
" / BW37	0	0,15	
HLA-BW17 / HLA-B27	1	1,45	0,481
" / BW35	4	2,37	
" / BW40	0	1,45	
" / BW15	0	1,83	
" / BW16	2	0,84	
" / B18	0	1,01	
" / BW21	1	0,61	2,828
" / BW22	1	0,84	
" / BW37	1	0,23	
HLA-B27 / HLA-BW35	6	3,13	

TABELLE 6 (Fortsetzung)

Art der Heterozygoten	Anzahl der beobachteten	Anzahl der erwarteten	Chi-Quadrat
HLA-B27 / HLA-BW40	1	1,91	0,085
" / BW15	0	2,37	
" / BW16	2	1,07	
" / B18	4	1,45	
" / BW21	1	0,76	
" / BW22	0	1,01	
" / BW37	0	0,30	
HLA-BW35 / HLA-BW40	1	3,05	0,547
" / BW15	4	3,90	
" / BW16	2	1,76	1,401
" / B18	3	2,30	
" / BW21	3	1,22	0,038
" / BW22	1	1,76	
" / BW37	1	0,53	
HLA-BW40 / HLA-BW15	3	2,29	0,071
" / BW16	2	1,07	
" / B18	0	1,37	
" / BW21	0	0,76	
" / BW22	1	1,07	
" / BW37	1	0,30	

TABELLE 6 (Fortsetzung)

Art der Heterozygoten	Anzahl der beobachteten	Anzahl der erwarteten	Chi-Quadrat
HLA-BW15 / HLA-BW16	0	1,30	
" / B18	0	1,75	
" / BW21	1	0,92	
" / BW22	1	1,30	
" / BW37	0	0,38	
HLA-BW16 / HLA-B18	1	0,76	1,962
" / BW21	0	0,46	
" / BW22	0	0,61	
" / BW37	1	0,15	
HLA-B18 / HLA-BW21	0	0,53	
" / BW22	1	0,76	
" / BW37	0	0,23	
HLA-BW21 / HLA-BW22	0	0,46	
" / BW37	0	0,15	
HLA-BW22 / HLA-BW37	0	0,15	
Gesamt:	382 ===	382,00 =====	32,214 =====

Gesamt-Chi-Quadrat: 32,214

Anzahl der Freiheitsgrade: 34

p = 0,750

mit einem gezählten Wert von 48 am häufigsten; vor A1/A2 mit 40, A2/A3 mit 36 und A2/A9 mit 30. Alle übrigen Heterozygoten des Locus A fallen zahlenmäßig gegenüber diesen vier Kombinationen stark ab. Bei ihnen treten wohl auch aufgrund der geringen Probengröße zum Teil sehr hohe Chi-Quadrat-Werte auf. Bei A2/A11 zum Beispiel wurden mit nur drei Heterozygoten wesentlich weniger beobachtet, als mit 9,32 zu erwarten gewesen wären. Dementsprechend hoch ist mit 4,285 der Chi-Quadrat-Wert. Signifikante Chi-Quadrat-Werte finden sich noch bei A3/A11 (8,625!) sowie bei A9/A11 (3,737). Es fällt auf, daß die drei höchsten Chi-Quadrat-Werte bei Heterozygoten vorkommen, die das Antigen HLA-A11 enthalten. Nur A1/AW32 weist eine ähnlich große Diskrepanz zwischen Beobachtungs- und Erwartungswert auf.

In Übereinstimmung mit der größeren Zahl der Allele des Locus B erreichen hier die Häufigkeiten der einzelnen Allel-Kombinationen bei weitem nicht die des Locus A. B7/B8 als häufigste Kombination wurde beispielsweise nur achtzehnmal beobachtet, B7/B12 zwölfmal. Nur wenige Heterozygoten erreichen eine Häufigkeit von zehn - das sind bei einer Probengröße von 382 2-3% (B7/B8 etwa 4,5%). Bei Locus A hatten die häufigsten Kombinationen immerhin einen Anteil von ungefähr 10% ! Bemerkenswert hohe Chi-Quadrat-Werte besitzen x/BW15 (3,2), x/B7 (2,1) sowie B7/B8 und B7/BW40. Die übrigen häufigen Heterozygoten weisen für Beobachtungs- und Erwartungswerte gute Übereinstimmung auf.

Der Anpassungswert $p = 0,055$ von Locus A liegt etwas unter der geforderten Marke von 0,1. Das p von Locus B dagegen übertrifft mit 0,750 diesen Wert sehr deutlich. Die gezählten Häufigkeiten stehen hier somit in gutem Einklang mit den auf der Basis der beteiligten Antigenfrequenzen errechneten Erwartungswerten. Käme zum

Beispiel zu der Reihe von Allel-Kombinationen des Locus B eine Kombination mit einem Antigen des Locus A hinzu, so würde sich der Gesamt-Chi-Quadrat-Wert des Locus B stark erhöhen und damit den p-Wert erniedrigen. Dies widerspräche der Hypothese zweier getrennter HLA-Loci.

4)2) Haplotypfrequenzen und Delta-Werte

4)2)1) Methodik

Für den Haplotyp, die Vererbungseinheit des HLA-Systems, ist eine Kenntnis der Häufigkeitsverteilung ebenfalls von großem Interesse. Wie die Genfrequenzen so sind auch die Haplotypfrequenzen am einfachsten durch Zählung zu ermitteln. Gezählt wurden die aus den Familienanalysen bestimmten Haplotypen der 382 Eltern. Schlösse man nicht eindeutig bestimmbare, HLA-Kopplungspaare von der Zählung aus, würde dies zu falschen Ergebnissen führen. Die Häufigkeiten dieser unklaren Haplotypen wurden auch hier mit Hilfe einer Wahrscheinlichkeitsrechnung bestimmt. Eine genaue Erläuterung derselben findet sich am Anfang dieses Kapitels. Die so ermittelten Werte wurden den jeweiligen Zählergebnissen zuaddiert. Tabelle 7 gibt einen vollständigen Überblick der errechneten Haplotypfrequenzen. Diese sind als Fraktion von 1 aufgeführt. Jedes einzelne Antigen des Locus A wurde mit sämtlichen Antigenen des Locus B kombiniert. Dadurch konnten alle bisher bekannten Haplotypen erfaßt werden. Von jedem Antigen des Locus A werden mit den Antigenen des Locus B siebzehn mögliche Haplotypen gebildet. Die Frequenzen dieser siebzehn Haplotypen müssen addiert

die Genfrequenz des betreffenden Locus-A-Antigens ergeben.

In Tabelle 7 sind weiterhin die zugehörigen Delta-Werte (C e p p e l l i n i (25)) für den einzelnen Haplotyp aufgeführt. Der "Linkage disequilibrium parameter" oder Delta-Wert gibt ein Maß für das Kopplungsungleichgewicht und ist definiert als die Differenz zwischen beobachteter Haplotypfrequenz und der aufgrund der Genfrequenzen beider beteiligter Antigene erwarteten Haplotypfrequenz. Es gilt folgende Formel:

$$\Delta_{i-j} = h_{i-j} - g_i \cdot g_j \quad (\text{M a t t i u z (52)})$$

Δ_{i-j} ist dabei das Kopplungsungleichgewicht für den Haplotyp i-j, h_{i-j} bezeichnet die beobachtete (durch Zählung ermittelte) Haplotypfrequenz von i-j. g_i und g_j stellen die jeweiligen Genfrequenzen von Antigen i bzw. j dar.

4)2)2) Ergebnisse

Bei Beginn dieser Arbeit waren zwölf Antigene des Locus A und sechzehn des Locus B bekannt, dazu jeweils die Anzahl der noch unbekannten Antigene x. Die Gesamtzahl der möglichen und hier aufgeführten HLA-Haplotypen beträgt demnach $13 \cdot 17 = 221$. Die Wahrscheinlichkeit, für jeden dieser Haplotypen positive Individuen zu finden, ist bei 382 getesteten Personen naturgemäß gering. Tatsächlich konnten nur bei den Haplotypen, die A2 oder A3 enthielten, für ihre sämtlichen siebzehn Kombinationen Positive gefunden werden. Dieses Ergebnis stimmt gut damit überein, daß A2 und A3 die höchsten Genfrequenzen des Locus A aufweisen. Bei A1 und A9, beides ebenfalls häufige Antigene, traten nur zwei, bzw. ein möglicher

TABELLE 7

Haplotypfrequenzen und Delta-Werte
 (Haplotypfrequenzen, durch Zählung ermittelt,
 als Fraktion von 1 .
 Delta-Werte berechnet für die häufigeren Haplotypen)
 (N = 382 Eltern von 191 Familien)

Haplotyp (Locus A / Locus B)	Haplotyp- frequenz	Delta- -Werte
HLA-A1/HLA-B5	0,0026	- 0,0061
" / B7	0,0134	- 0,0095
" / B8	0,0890	+ 0,0730
" / B12	0,0026	- 0,0150
" / B13	0,0013	- 0,0051
" / B14	0,0021	- 0,0022
" / BW17	0,0120	+ 0,0064
" / B27	-	- 0,0074
" / BW35	0,0019	- 0,0102
" / BW40	-	- 0,0073
" / BW15	0,0026	- 0,0066
" / BW16	0,0026	- 0,0015
" / B18	0,0045	- 0,0010
" / BW21	0,0013	- 0,0017
" / BW22	0,0013	- 0,0028
" / BW37	0,0039	+ 0,0027
" / X	0,0070	- 0,0042

0,1484

(= Genfrequenz
 von HLA-A1)

TABELLE 7 (Fortsetzung)

Haplotyp (Locus A / Locus B)	Haplotyp- frequenz	Delta- Werte
HLA-A2/HLA-B5	0,0290	+ 0,0111
" / B7	0,0390	- 0,0081
" / B8	0,0020	- 0,0308
" / B12	0,0510	+ 0,0151
" / B13	0,0190	+ 0,0059
" / B14	0,0019	- 0,0069
" / BW17	0,0118	+ 0,0002
" / B27	0,0220	+ 0,0068
" / BW35	0,0230	- 0,0019
" / BW40	0,0250	+ 0,0101
" / BW15	0,0270	+ 0,0082
" / BW16	0,0055	- 0,0030
" / B18	0,0118	+ 0,0006
" / BW21	0,0053	- 0,0008
" / BW22	0,0065	- 0,0020
" / BW37	0,0013	- 0,0011
" / X	0,0230	- 0,0001

0,3040

(= Genfrequenz
von HLA-A2)

TABELLE 7 (Fortsetzung)

Haplotyp (Locus A / Locus B)	Haplotyp- frequenz	Delta- Werte
HLA-A3/HLA-B5	0,0039	- 0,0051
" / B7	0,0620	+ 0,0383
" / B8	0,0046	- 0,0119
" / B12	0,0065	- 0,0116
" / B13	0,0013	- 0,0053
" / B14	0,0024	- 0,0020
" / BW17	0,0026	- 0,0032
" / B27	0,0065	- 0,0012
" / BW35	0,0230	+ 0,0105
" / BW40	0,0053	- 0,0022
" / BW15	0,0065	- 0,0030
" / BW16	0,0013	- 0,0030
" / B18	0,0065	+ 0,0008
" / BW21	0,0026	- 0,0005
" / BW22	0,0065	+ 0,0022
" / BW37	0,0013	+ 0,0001
" / X	0,0082	- 0,0034

 0,1530

 (= Genfrequenz
 von HLA-A3)

TABELLE 7 (Fortsetzung)

Haplotyp (Locus A / Locus B)	Haplotyp- frequenz	Delta- Werte
HLA-A9/HLA-B5	0,0065	- 0,0001
" / B7	0,0140	- 0,0034
" / B8	-	- 0,0121
" / B12	0,0230	+ 0,0098
" / B13	0,0053	+ 0,0005
" / B14	0,0013	- 0,0019
" / BW17	0,0026	- 0,0017
" / B27	0,0065	+ 0,0009
" / BW35	0,0130	+ 0,0038
" / BW40	0,0039	- 0,0016
" / BW15	0,0140	+ 0,0071
" / BW16	0,0039	+ 0,0008
" / B18	0,0039	- 0,0002
" / BW21	0,0039	+ 0,0017
" / BW22	0,0053	+ 0,0022
" / BW37	0,0013	+ 0,0004
" / X	0,0032	- 0,0053

 0,1125

 (= Genfrequenz
 von HLA-A9)

TABELLE 7 (Fortsetzung)

Haplotyp (Locus A / Locus B)	Haplotyp- frequenz	Delta- -Werte
HLA-A10/HLA-B5	-	- 0,0032
" / B7	0,0053	- 0,0032
" / B8	0,0033	- 0,0026
" / B12	0,0034	- 0,0031
" / B13	0,0026	+ 0,0002
" / B14	0,0039	+ 0,0023
" / BW17	0,0013	- 0,0008
" / B27	0,0100	+ 0,0072
" / BW35	0,0026	- 0,0019
" / BW40	0,0013	- 0,0014
" / BW15	-	- 0,0034
" / BW16	0,0065	+ 0,0050
" / B18	0,0053	+ 0,0033
" / BW21	-	- 0,0011
" / BW22	-	- 0,0015
" / BW37	-	- 0,0004
" / X	0,0084	+ 0,0042
	0,0551	

(= Genfrequenz
von HLA-A10)

TABELLE 7 (Fortsetzung)

Haplotyp (Locus A / Locus B)	Haplotyp- frequenz	Delta- Werte
HLA-A11/HLA-B5	0,0053	+ 0,0029
" / B7	0,0013	- 0,0049
" / B8	0,0013	- 0,0030
" / B12	-	- 0,0047
" / B13	-	- 0,0017
" / B14	-	- 0,0012
" / BW17	0,0026	+ 0,0011
" / B27	-	- 0,0020
" / BW35	0,0146	+ 0,0113
" / BW40	0,0013	- 0,0007
" / BW15	0,0039	+ 0,0014
" / BW16	0,0013	+ 0,0002
" / B18	0,0013	- 0,0002
" / BW21	-	- 0,0008
" / BW22	0,0026	+ 0,0015
" / BW37	-	- 0,0003
" / X	0,0032	+ 0,0002

 0,0402

 (= Genfrequenz
 von HLA-A11)

TABELLE 7 (Fortsetzung)

Haplotyp (Locus A / Locus B)	Haplotyp- frequenz	Delta- -Werte
HLA-A28/HLA-B5	0,0026	+ 0,0007
" / B7	0,0039	- 0,0011
" / B8	-	- 0,0035
" / B12	0,0079	+ 0,0041
" / B13	-	- 0,0014
" / B14	0,0039	+ 0,0030
" / BW17	-	- 0,0012
" / B27	0,0013	- 0,0003
" / BW35	0,0026	-
" / BW40	0,0026	+ 0,0010
" / BW15	-	- 0,0020
" / BW16	0,0013	+ 0,0004
" / B18	0,0013	+ 0,0001
" / BW21	0,0013	+ 0,0038
" / BW22	-	- 0,0009
" / BW37	-	- 0,0003
" / X	0,0026	+ 0,0002

 0,0321

 (= Genfrequenz
 von HLA-A28)

TABELLE 7 (Fortsetzung)

Haplotyp (Locus A / Locus B)	Haplotyp- frequenz	Delta- Werte
HLA-A29/HLA-B5	-	- 0,0015
" / B7	0,0053	+ 0,0013
" / B8	0,0013	- 0,0015
" / B12	0,0074	+ 0,0043
" / B13	0,0013	+ 0,0002
" / B14	-	- 0,0008
" / BW17	0,0013	+ 0,0003
" / B27	-	- 0,0013
" / BW35	0,0026	+ 0,0005
" / BW40	-	- 0,0013
" / BW15	0,0026	+ 0,0010
" / BW16	0,0026	+ 0,0019
" / B18	-	- 0,0010
" / BW21	0,0013	+ 0,0008
" / BW22	-	- 0,0007
" / BW37	-	- 0,0002
" / X	0,0007	- 0,0013

D,0261

(= Genfrequenz
von HLA-A29)

TABELLE 7 (Fortsetzung)

Haplotyp (Locus A / Locus B)	Haplotyp- frequenz	Delta- Werte
HLA-AW30/HLA-B5	0,0013	+ 0,0026
" / B7	-	-
" / B8	-	-
" / B12	-	-
" / B13	0,0013	-
" / B14	-	-
" / BW17	-	-
" / B27	-	-
" / BW35	-	-
" / BW40	0,0013	-
" / BW15	-	-
" / BW16	-	-
" / B18	-	-
" / BW21	-	-
" / BW22	0,0013	-
" / BW37	-	-
" / X	0,0013	-
	0,0065	
	(= Genfrequenz von HLA-AW30)	

TABELLE 7 (Fortsetzung)

Haplotyp (Locus A / Locus B)	Haplotyp- frequenz	Delta- -Werte
HLA-AW31/HLA-B5	-	-
" / B7	-	-
" / B8	-	-
" / B12	-	-
" / B13	0,0039	+ 0,0032
" / B14	-	-
" / BW17	-	-
" / B27	-	-
" / BW35	0,0039	+ 0,0026
" / BW40	0,0026	+ 0,0018
" / BW15	-	-
" / BW16	-	-
" / B18	0,0013	-
" / BW21	0,0026	+ 0,0023
" / BW22	0,0013	-
" / BW37	-	-
" / X	-	-

 0,0161

 (= Genfrequenz
 von HLA-AW31)

TABELLE 7 (Fortsetzung)

Haplotyp (Locus A / Locus B)	Haplotyp- frequenz	Delta- -Werte
HLA-AW32/HLA-B5	0,0026	+ 0,0006
" / B7	0,0065	+ 0,0012
" / B8	0,0026	- 0,0011
" / B12	0,0065	+ 0,0025
" / B13	-	-
" / B14	-	-
" / BW17	0,0013	-
" / B27	0,0013	-
" / BW35	0,0026	+ 0,0011
" / BW40	0,0026	+ 0,0009
" / BW15	0,0039	+ 0,0018
" / BW16	0,0013	-
" / B18	-	-
" / BW21	0,0013	-
" / BW22	-	-
" / BW37	-	-
" / X	0,0013	-

 0,0340

 (= Genfrequenz
 von HLA-AW32)

TABELLE 7 (Fortsetzung)

Haplotyp (Locus A / Locus B)	Haplotyp- frequenz	Delta- Werte
HLA-L1/HLA-B5	-	-
" / B7	-	-
" / B8	0,0013	-
" / B12	0,0026	+ 0,0015
" / B13	0,0026	+ 0,0022
" / B14	-	-
" / BW17	-	-
" / B27	-	-
" / BW35	-	-
" / BW40	-	-
" / BW15	-	-
" / BW16	-	-
" / B18	-	-
" / BW21	-	-
" / BW22	0,0026	+ 0,0023
" / BW37	-	-
" / X	-	-

 0,0090

 (= Genfrequenz
 von HLA-L1)

TABELLE 7 (Fortsetzung)

Haplotyp (Locus A / Locus B)	Haplotyp- frequenz	Delta- -Werte
HLA-X/HLA-B5	0,0053	+ 0,0016
" / B7	0,0032	- 0,0066
" / B8	0,0025	- 0,0043
" / B12	0,0067	- 0,0007
" / B13	0,0045	+ 0,0018
" / B14	0,0120	+ 0,0102
" / BW17	0,0013	- 0,0011
" / B27	-	- 0,0032
" / BW35	0,0040	- 0,0012
" / BW40	0,0026	- 0,0005
" / BW15	0,0010	- 0,0029
" / BW16	0,0016	- 0,0002
" / B18	0,0008	- 0,0015
" / BW21	-	- 0,0013
" / BW22	-	- 0,0018
" / BW37	-	- 0,0005
" / X	0,0170	+ 0,0122

 0,0630

 (= Genfrequenz
 von HLA-X)

Haplotyp nicht auf. Mit sinkender Genfrequenz erhöht sich die Zahl der zwar möglichen, aber in der Stichprobe nicht aufgetretenen Haplotypen. So konnten von den siebzehn möglichen Kombinationen mit HLA-AW30 nur fünf bei der vorliegenden Untersuchung nachgewiesen werden.

Wie aufgrund früherer Untersuchungen (A l b e r t (10)) zu erwarten war, kommt der Haplotyp A1-B8 mit Abstand am häufigsten vor. Seine Frequenz beträgt 0,0890. Bei der Betrachtung der zugehörigen Genfrequenzen von A1 und B8 fällt auf, daß diese, für sich genommen gar nicht so häufig sind, um eine derart hohe Haplotypfrequenz zustande zu bringen. Die Genfrequenz von HLA-A1 beträgt 0,148, die von B8 0,108. Dementsprechend groß ist mit + 0,0730 der Delta-Wert. Es handelt sich um ein positives Kopplungsungleichgewicht zwischen den beiden Loci des HLA-Systems für A1 und B8.

In der Häufigkeit an nächster Stelle wurde der Haplotyp A3-B7 mit 0,0620 Haplotypfrequenz gefunden. Auch hier liegt ein Kopplungsungleichgewicht vor, das sich in einem positiven Delta von 0,0383 äussert.

Erst an dritter Stelle steht ein Haplotyp, der das häufigste HLA-Antigen, A2, beinhaltet. Es handelt sich um die Kombination A2-B12 mit einer Frequenz von 0,0510 und einem Delta-Wert von + 0,0151. Weiterhin signifikant in der Häufigkeit ist A2-B7 mit einer Frequenz von 0,0390. Ein Kopplungsungleichgewicht ist hier nicht festzustellen.

Deutlich seltener als erwartet, mit negativem Kopplungsungleichgewicht und entsprechendem Delta von - 0,0308, fand sich der Haplotyp A2-B8. Eine Zusammenstellung der Haplotypen mit Delta-Werten über 0,01 sei hier angegeben:

Haplotyp	Delta-Wert
A1 - B8 :	+ 0,0730
A1 - B12 :	- 0,0150
A1 - BW35 :	- 0,0102
A2 - B5 :	+ 0,0111
A2 - B8 :	- 0,0308
A2 - B12 :	+ 0,0151
A2 - BW40 :	+ 0,0101
A3 - B7 :	+ 0,0383
A3 - B8 :	- 0,0119
A3 - B12 :	- 0,0116
A3 - BW35 :	+ 0,0105
A9 - B8 :	- 0,0121
A11 - BW35 :	+ 0,0113
x - B14 :	+ 0,0102
x - x :	+ 0,0122

4)2)3) Ermittlung der Haplotypfrequenzen mittels
Berechnung aus den Phänotypdaten; durch-
geführt für die häufigsten Haplotypen

Es gibt auch die Möglichkeit, die Haplotypfrequenzen aus Phänotypdaten zu berechnen. Von ihr wird vor allem dann Gebrauch gemacht, wenn eine Deduktion der Haplotypen aus Familienanalysen nicht möglich ist. Um die Genauigkeit einer solchen Berechnung zu prüfen, wurden für die häufigsten Haplotypen die zugehörigen gezählten Frequenzen mit den berechneten Werten verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 gegenübergestellt.

Bei der Berechnung geht man von den sogenannten "Zwei mal zwei-Tabellen" der Phänotypen aus. Dort kann abgelesen werden, wie häufig zum Beispiel HLA-A1 und B8 gemeinsam in einem Phänotyp vorkommen (+/+), wie oft A1 ohne B8 (+/-) bzw. B8 ohne A1 (-/+) vorkommt und wie groß die Zahl der Phänotypen ist, bei denen weder A1

TABELLE 8

Vergleich der Ergebnisse aus Haplotypzählung
und -berechnung zur Bestimmung der Haplotyp-
frequenzen, durchgeführt für die häufigsten
Haplotypen.

(N = 382 Eltern von 191 Familien)

Haplotyp	Haplotyp- zählung	Berechnung der Haplotypen aus den Phänotypdaten
HLA-A1/HLA-B8	0,0890	0,0936
HLA-A2/HLA-B5	0,0290	0,0240
HLA-A2/HLA-B7	0,0390	0,0465
HLA-A2/HLA-B12	0,0510	0,0485
HLA-A2/HLA-BW35	0,0230	0,0273
HLA-A2/HLA-BW40	0,0250	0,0184
HLA-A2/HLA-BW15	0,0270	0,0307
HLA-A3/HLA-B7	0,0620	0,0653
HLA-A3/HLA-BW35	0,0230	0,0224
HLA-A9/HLA-BW15	0,0140	0,0139
HLA-A11/HLA-BW35	0,0146	0,0167

noch B8 (-/-) gefunden werden. Aus den so ermittelten vier Werten ergibt sich bei Anwendung der von M i c k e y et al. (59) und M a t t i u z et al. (52) angegebenen Formel die Haplotypfrequenz als:

$$h_{i-j} = \frac{\sqrt{N} - \sqrt{C} - \sqrt{B} + \sqrt{d}}{\sqrt{N}}$$

N ist dabei die Anzahl der positiven Reaktionen für das Antigen j, B die der positiven Reaktionen für i, d die Zahl der Individuen die phänotypisch sowohl für i als auch für j negativ sind. i und j sind Antigene des Locus A und B. Nach diesem Schema können sämtliche Antigenkombinationen zwischen den beiden HLA-Loci berechnet werden.

Der Vergleich wurde für die elf häufigsten Haplotypen durchgeführt und ergab nicht überall gute Übereinstimmung. Die größte Diskrepanz weist A2-BW40 mit etwa 26% Abweichung von der durch Zählung ermittelten Haplotypfrequenz auf. Größere Unterschiede fanden sich noch bei:

HLA-A2	-	B5	:	17%
A2	-	B7	:	19%
A2	-	BW35	:	18%

4)3) Segregationsanalyse

4)3)1) Segregation einzelner Antigene

Die vorliegenden 191 kinderreichen Familien boten ein ausgezeichnetes Material zur Durchführung einer Segregationsanalyse. Die Auswahl der einzelnen HLA-Antigene in der vorhandenen Population, also ihre Vererbung von den Eltern auf die Kinder, wurde unter verschiedenen

Gesichtspunkten untersucht (siehe Tabelle 9 und 10): Am Anfang stand die Ermittlung der Zahl derjenigen Familien, die für ein bestimmtes Antigen positiv waren, d.h., ein Elternteil, paternal oder maternal, mußte das betreffende Antigen besitzen. Von jeder dieser positiven Familien wurde die Anzahl der Kinder, in männlich und weiblich aufgeschlüsselt, festgestellt, denen das Antigen vererbt worden war. Das Geschlecht wurde berücksichtigt, um eventuelle geschlechtsgebundene Präferenzen im Erbmodus sichtbar machen zu können. Als Gegenprobe sind in derselben Weise die Kinder aufgeführt, denen - in der positiven Familie - das betreffende Antigen nicht vererbt wurde.

Jede einzelne HLA-Spezifität des Locus A und B wurde so auf seine Segregation untersucht. Das Verhältnis der Anzahl der positiven und negativen Nachkommen in Bezug auf ein definiertes Antigen läßt sich mit Hilfe eines Chi-Quadrat-Tests charakterisieren. Die hierbei anzuwendende Formel lautet:

$$\text{Chi-Quadrat} = \frac{\left\{ \text{Anzahl d. Positiven} - \frac{\text{Gesamtzahl d. Kinder}^2}{\text{Gesamtzahl d. Kinder}} \right\}}{2}$$

Gesamtzahl d. Kinder ist dabei die Anzahl der erwarteten Positiven, da bei normalem Erbgang genau die Hälfte der Nachkommen ein dominant vererbbares Merkmal der Eltern erhält. Voraussetzung ist natürlich Heterozygotie bezüglich dieses Merkmals. Familien, bei denen ein Elternteil für das betreffende Merkmal homozygot ist oder in denen beide Eltern dasselbe besitzen, können, um das Bild nicht zu verfälschen nicht berücksichtigt werden.

TABELLE 9

Segregation einzelner Antigene

Locus A

	Anzahl der Familien			Anzahl der Positiven			Anzahl der Negativen			Chi- Quadrat	* Segr. Freq.
	pater- nal	mater- nal	gesamt	männl.	weibl.	gesamt	männl.	weibl.	gesamt	Anzahl der Kinder	
HLA-A 1	45	46	91	80	75	155	81	84	165	320	0,485
HLA-A 2	67	84	151	153	144	297	146	121	267	564	0,527
HLA-A 3	43	51	94	93	79	172	78	97	175	347	0,496
HLA-A 9	36	44	80	74	60	134	69	85	154	288	0,465
HLA-A 10	20	16	36	32	36	68	26	30	56	124	0,548
HLA-A 11	10	19	29	29	33	62	32	27	59	121	0,512
HLA-A 28	14	9	23	17	20	37	16	14	30	67	0,551
HLA-A 29	11	10	21	22	20	42	14	23	37	79	0,531
HLA-AW 30	2	3	5	-	1	1	7	7	14	15	-
HLA-AW 31	6	6	12	7	12	19	7	12	19	38	0,500
HLA-AW 32	11	12	23	17	26	43	24	19	43	86	0,500
Li	4	3	7	7	7	14	7	6	13	27	-

* Segregationsfrequenz =

$$\frac{\text{Anzahl der Positiven}}{\text{Anzahl der Kinder (gesamt)}}$$

TABELLE 10

Segregation einzelner Antigene

Locus B

		Anzahl der Familien			Anzahl der Positiven			Anzahl der Negativen			Anzahl der Kinder	Chi- Quadrat	Segr.* Freq.
		pater- nal	mater- nal	gesamt	männl.	weibl.	gesamt	männl.	weibl.	gesamt			
HLA-B	5	12	29	41	39	32	71	38	31	69	140	0,014	0,507
HLA-B	7	51	62	113	108	95	203	107	92	199	402	0,020	0,504
HLA-B	8	41	38	79	72	79	151	70	73	143	294	0,108	0,514
HLA-B	12	45	37	82	73	83	156	72	66	138	294	0,550	0,531
HLA-B	13	17	16	33	28	29	57	23	36	59	116	0,017	0,491
HLA-B	14	9	12	21	21	20	41	15	22	37	78	0,102	0,525
HLA-BW	17	14	14	28	22	20	42	18	26	44	86	0,023	0,490
HLA-B	27	27	9	36	29	37	66	33	30	63	129	0,035	0,512
HLA-BW	35	34	29	63	61	55	116	51	47	98	214	0,756	0,542
HLA-BW	40	20	15	35	29	28	57	35	28	63	120	0,150	0,475
HLA-BW	15	19	25	44	48	53	101	38	32	70	171	2,460	0,590
HLA-BW	16	10	11	21	25	20	45	17	15	32	77	1,140	0,585
HLA-B	18	12	15	27	29	22	51	22	24	46	97	0,129	0,526
HLA-BW	21	9	7	16	15	16	31	13	18	31	62	0,000	0,500
HLA-BW	22	8	12	20	16	19	35	16	23	39	74	0,108	0,473
HLA-BW	37	2	4	6	4	6	10	3	8	11	21	-	-

* Formel siehe Tabelle 9

Die Segregationshäufigkeit eines Antigen wird durch seine Segregationsfrequenz ausgedrückt:

$$\text{Segregationsfrequenz} = \frac{\text{Anzahl d. Positiven}}{\text{Gesamtz.d.Kinder}}$$

Erwartungsgemäß liegen die Segregationsfrequenzen beider Loci um 0,5, d.h., kein Antigen wird bevorzugt vererbt. Etwas größere Abweichungen ergaben sich lediglich bei folgenden HLA-Spezifitäten:

Segr.Freq.

HLA-A9	:	0,465
" A10	:	0,548
" A28	:	0,551
" BW15	:	0,590
" BW16	:	0,585

Relativ hohe Chi-Quadrat-Werte weisen nur BW15 mit 2,460 und BW16 mit 1,140 auf. Für beide wurden unerwartet viele Positive gefunden. Entsprechend sind auch ihre Segregationsfrequenzen am höchsten.

HLA-A11 kommt fast doppelt so oft beim maternalen als beim paternalen Elternteil vor. Die Segregation ist hier allerdings nur geringfügig zur weiblichen Seite hin verschoben. Noch stärker ausgeprägt ist dieses Ungleichgewicht bei B5, wo von 41 positiven Familien 29 Mütter, aber nur 12 Väter dieses Antigen besaßen. Dagegen wurde B5 häufiger an männliche als an weibliche Nachkommen weitergegeben. Dreimal so viele Väter als Mütter waren für B27 positiv. Aber auch diese Spezifität wurde dafür mehr an Mädchen als an Knaben vererbt, was wiederum einer Bevorzugung des männlichen Geschlechts durch B27 widerspricht. Andernfalls hätten nämlich mehr männliche als weibliche Nachkommen dieses Antigen erben

müssen. Allgemein fällt folgendes auf:

Wurde ein Elternteil, zum Beispiel der paternale, von einem Antigen besonders bevorzugt (fand man es also in unserem Beispiel bei Vätern wesentlich häufiger als bei Müttern), so tauchte dieses Antigen dafür in der nächsten Generation bei den Nachkommen weiblichen Geschlechts häufiger auf und umgekehrt. Die hier beschriebenen Abweichungen sind daher wohl als zufallsbedingt anzusehen.

4)3)2) Segregation von Haplotypen

In ähnlicher Weise wie die Segregation einzelner Antigene läßt sich auch untersuchen, wie die Haplotypen im HLA-System vererbt werden. Dafür wurden nur die häufigen Haplotypen herangezogen, da nur bei ihnen das vorhandene Material an Familien groß genug erschien, um repräsentative Ergebnisse zu erbringen.

Auffallend positive Segregationsfrequenz zeigten die Haplotypen A2 - B12 und A2 - B7 mit 0,567 bzw. 0,581. Ihre Chi-Quadrat-Werte liegen deutlich über 1.

Der Haplotyp A2 - B5 zeigt eine starke Verschiebung zur maternalen Seite hin (fünfzehnmal bei den Müttern und nur viermal bei den Vätern beobachtet). A3 - B7 verhält sich ähnlich, während A2 - B27 paternal wesentlich stärker vertreten ist. Eine geschlechtsgebundene Vererbung konnte wie erwartet bei den HLA-Haplotypen nicht festgestellt werden.

TABELLE 11

Segregation von häufigen Haplotypen

	Anzahl der Familien			Anzahl der Positiven			Anzahl der Negativen			Anzahl der Kinder	Chi- Quadrat	Segr.* Freq.
	pater- nal	mater- nal	gesamt	männl.	weibl.	gesamt	männl.	weibl.	gesamt			
HLA-A1/HLA-B 8	32	27	59	49	52	101	54	52	106	207	0,063	0,488
HLA-A2/HLA-B 5	4	15	19	19	17	36	16	15	31	67	0,186	0,538
HLA-A2/HLA-B 7	16	11	27	29	21	50	22	14	36	86	1,140	0,581
HLA-A2/HLA-B 12	20	19	39	46	42	88	29	38	67	155	1,420	0,567
HLA-A2/HLA-B 13	8	6	14	12	13	25	13	15	28	53	0,085	0,472
HLA-A2/HLA-B 27	13	4	17	16	18	34	15	15	30	64	0,125	0,531
HLA-A2/HLA-BW35	7	6	13	13	10	23	7	8	15	38	0,844	0,606
HLA-A2/HLA-BW40	12	8	20	16	20	36	22	11	33	69	0,065	0,520
HLA-A2/HLA-BW15	11	10	21	17	22	39	29	15	44	83	0,151	0,470
HLA-A3/HLA-B 7	17	29	46	45	32	77	43	46	89	166	0,433	0,464
HLA-A3/HLA-BW35	10	8	18	24	14	38	13	16	29	67	0,608	0,566
HLA-A9/HLA-B 7	4	7	11	11	9	20	11	14	25	45	0,278	0,445
HLA-A9/HLA-B 12	8	8	16	10	12	22	14	12	26	48	0,166	0,460
HLA-A9/HLA-BW15	3	9	12	16	9	25	13	12	25	50	0,000	0,500

* Formel siehe Tabelle 9

4)3)3) Segregation von einzelnen Haplotypen
in Familien verschiedener Größe

Schließlich ist von Interesse, wie die einzelnen HLA-Antigene bezüglich der Familiengröße segregieren, ob letztere also auf die Segregation einen Einfluß hat. Dazu wurde der gesamte Vorrat an Familien in Gruppen mit gleicher Kinderzahl aufgeteilt. Größe 3 zum Beispiel entspricht einer Familie mit drei Kindern. Lag die Kinderzahl über 5, so wurden die ersten fünf Kinder berücksichtigt und diese Familien der Gruppe mit Größe 5 zugeteilt. Andernfalls hätte man für die besonders kinderreichen Familien zu kleine Populationen erhalten, die keine brauchbaren Ergebnisse mehr geliefert hätten. Familien, deren einer Elternteil homozygot für das zu untersuchende Antigen war oder bei denen beide Elternteile dasselbe Antigen besaßen, konnten wie in den vorhergehenden Untersuchungen nicht mitgezählt werden; eine freie Segregation wäre dann nicht mehr gegeben. Das Ergebnis hätte sich in diesem Fall zwangsläufig zugunsten der für das betreffende HLA-Antigen Positiven verschoben.

In den Tabellen 12-19 finden sich die erarbeiteten Ergebnisse. Die Genfrequenz der einzelnen Antigene ist darin vorangestellt, um einen Vergleich mit der Segregationsfrequenz zu ermöglichen. Die Anzahl der positiven Familien meint die positiven Familien in Bezug auf ein bestimmtes Antigen. Davon wiederum segregiert ein gewisser Teil, vererbt also diese Spezifität weiter: "Anzahl der segregierenden Familien". Segregation ist dann gegeben, wenn das Antigen auf mindestens ein Kind weitervererbt wird. Für die Segregationsfrequenz läßt sich ein Erwartungswert berechnen, abhängig von der Genfrequenz des betreffenden Antigens:

$f = (1 - h) \cdot (1 - y^s)$ (M a t t i u z et al. (52))

h ist dabei das Verhältnis von Homozygoten zu Heterozygoten bezüglich des untersuchten Antigens:

$$h = \frac{p^2}{p^2 + 2 pq} = \frac{p}{p + 2 q}$$

Mit p geht hier die Genfrequenz des Antigens ein.

q ist die Frequenz der für das Antigen Negativen:

$$q = 1 - p$$

y bezeichnet die Segregationsfrequenz. Es ist zum Beispiel für Familien der Größe 2 gleich 0,5. s steht für die Anzahl der Kinder.

Mit Hilfe von f (erwartet) (= erwartete Segregationsfrequenz) läßt sich der Erwartungswert für die Anzahl der segregierenden Familien errechnen. Dazu multipliziert man die Zahl der positiven Familien mit der erwarteten Segregationsfrequenz: "Anzahl der segregierenden Familien - erwartet" = "Anzahl der positiven Familien". "Segregationsfrequenz (erwartet)".

Zum Schluß steht der Vergleich zwischen beobachteter und erwarteter Zahl der segregierenden Familien, dargestellt mit Hilfe des Chi-Quadrat-Wertes.

Die stärksten Abweichungen von den Erwartungswerten ergaben sich für das Antigen A2. Bei Familien der Größe 2 wurden um nahezu 50% mehr Segregationen für A2 gezählt, als dem Erwartungswert entspricht. Hier war auch das Verhältnis von Homozygoten zu Heterozygoten mit $h = 0,178$ deutlich höher als bei allen anderen Antigenen. Der Chi-Quadrat-Wert beträgt 2,775 entsprechend dem großen Unterschied. Auch bei den restlichen untersuchten Familiengrößen (Größe 3, 4 und 5) zeigt A2 die deutlichsten Abweichungen (Familien Größe 3: Chi-Quadrat = 1,850; $h = 0,178$),

TABELLE 12

Segregation von einzelnen Antigenen
in Familien der Größe 2 (2 Kinder)
Anzahl der Familien = 47

Locus A

Gen- frequenz	Erwartete Segregations- frequenz	* h	Anzahl d. positiven Familien	Anzahl d. segr.Fam. (gezählt)	Anzahl d. segr.Fam. (erwartet)	Chi- Quadrat
HLA-A 1	0,148	0,080	16	13	11,00	0,364
HLA-A 2	0,304	0,178	21	19	13,00	2,775
HLA-A 3	0,153	0,083	15	11	10,03	0,085
HLA-A 9	0,112	0,060	22	18	15,50	0,403
HLA-A 10	0,055	0,028	10	9	7,30	0,395
HLA-A 11	0,040	0,020	3	2	2,20	0,256
HLA-A 28	0,032	0,016	12	11	8,88	0,508
HLA-A 29	0,026	0,013	5	4	3,70	0,024
HLA-AW 30	0,006	0,003	0	0	-	-
HLA-AW 31	0,016	0,008	3	3	2,23	0,270
HLA-AW 32	0,034	0,017	3	0	2,20	-
Li	0,009	0,004	3	2	2,24	0,025

* h = Verhältnis von Homozygoten
zu Heterozygoten

TABELLE 13

Segregation von einzelnen Antigenen
in Familien der Größe 2 (2 Kinder)
Anzahl der Familien = 47

L o c u s B

	Gen- frequenz	Erwartete Segregations- frequenz	* h	Anzahl d. positiven Familien	Anzahl d. segr. Fam. (gezählt)	Anzahl d. segr. Fam. (erwartet)	Chi- Quadrat
HLA-B 5	0,059	0,730	0,030	11	8	8,00	0,000
HLA-B 7	0,155	0,688	0,084	19	14	13,10	0,062
HLA-B 8	0,108	0,708	0,057	13	11	9,20	0,331
HLA-B 12	0,118	0,702	0,063	14	11	9,84	0,137
HLA-B 13	0,043	0,736	0,020	7	6	5,16	0,136
HLA-B 14	0,029	0,740	0,015	5	4	3,70	0,024
HLA-BW 17	0,038	0,736	0,019	8	4	5,90	0,610
HLA-B 27	0,050	0,730	0,026	6	6	4,40	0,580
HLA-BW 35	0,082	0,716	0,043	14	11	10,00	0,100
HLA-BW 40	0,049	0,731	0,025	7	6	5,12	0,150
HLA-BW 15	0,062	0,725	0,032	7	7	5,08	0,730
HLA-BW 16	0,028	0,738	0,014	5	4	3,70	0,024
HLA-B 18	0,037	0,735	0,019	4	4	2,94	0,382
HLA-BW 21	0,020	0,744	0,011	2	1	1,50	0,250
HLA-BW 22	0,028	0,738	0,014	3	3	2,22	0,290
HLA-BW 37	0,008	0,748	0,004	3	2	2,24	0,256

* Formel siehe Tabelle 12

TABELLE 14

Segregation von einzelnen Antigenen
in Familien der Größe 3 (3 Kinder)
Anzahl der Familien = 60

L o c u s A

	Gen- frequenz	Erwartete Segregations- frequenz	h	Anzahl der positiven Familien	Anzahl der segr.Fam. (gezählt)	Anzahl der segr.Fam. (erwartet)	Chi- Quadrat
HLA-A 1	0,148	0,805	0,080	18	14	14,50	0,017
HLA-A 2	0,304	0,720	0,178	24	23	17,30	1,850
HLA-A 3	0,153	0,803	0,083	19	19	15,30	0,910
HLA-A 9	0,112	0,823	0,060	18	15	14,80	0,003
HLA-A 10	0,055	0,850	0,028	7	7	5,95	0,185
HLA-A 11	0,040	0,855	0,020	13	13	11,12	0,325
HLA-A 28	0,032	0,861	0,016	4	4	3,45	0,088
HLA-A 29	0,026	0,865	0,013	5	4	4,32	0,024
HLA-AW 30	0,006	0,872	0,003	2	0	1,75	-
HLA-AW 31	0,016	0,866	0,008	2	1	1,73	0,305
HLA-AW 32	0,034	0,861	0,017	9	8	7,75	0,008
Li	0,009	0,870	0,004	0	0	-	-

TABELLE 15

Segregation von einzelnen Antigenen
in Familien der Größe 3 (3 Kinder)
Anzahl der Familien = 60

L o c u s B

	Gen- frequenz	Erwartete Segregations- frequenz	h	Anzahl der positiven Familien	Anzahl der segr. Fam. (gezählt)	Anzahl der segr. Fam. (erwartet)	Chi- Quadrat
HLA-B 5	0,059	0,850	0,030	10	9	8,50	0,030
HLA-B 7	0,155	0,800	0,084	21	20	16,80	0,630
HLA-B 8	0,108	0,825	0,057	22	18	18,20	0,002
HLA-B 12	0,118	0,821	0,063	19	19	15,60	0,740
HLA-B 13	0,043	0,858	0,020	10	8	8,58	0,040
HLA-B 14	0,029	0,861	0,015	5	4	4,30	0,021
HLA-BW 17	0,038	0,860	0,019	8	7	6,88	0,002
HLA-B 27	0,050	0,850	0,026	11	11	9,35	0,290
HLA-BW 35	0,082	0,836	0,043	16	14	13,40	0,027
HLA-BW 40	0,049	0,852	0,025	9	9	7,65	0,240
HLA-BW 15	0,062	0,846	0,032	10	7	8,46	0,251
HLA-BW 16	0,028	0,862	0,014	3	3	2,60	0,062
HLA-B 18	0,037	0,860	0,019	9	9	7,75	0,210
HLA-BW 21	0,020	0,863	0,011	6	6	5,20	0,124
HLA-BW 22	0,028	0,862	0,014	6	3	5,16	0,910
HLA-BW 37	0,008	0,871	0,004	0	0	-	-

TABELLE 16

Segregation von einzelnen Antigenen
in Familien der Größe 4 (4 Kinder)
Anzahl der Familien = 51

L o c u s A

	Gen- frequenz	Erwartete Segregations- frequenz	h	Anzahl der positiven Familien	Anzahl der segr.Fam. (gezählt)	Anzahl der segr.Fam. (erwartet)	Chi- Quadrat
HLA-A 1	0,148	0,861	0,080	23	21	19,80	0,073
HLA-A 2	0,304	0,770	0,178	25	23	19,20	0,750
HLA-A 3	0,153	0,858	0,083	18	16	15,40	0,023
HLA-A 9	0,112	0,880	0,060	14	13	12,30	0,040
HLA-A 10	0,055	0,910	0,028	8	8	7,30	0,067
HLA-A 11	0,040	0,918	0,020	6	6	5,50	0,046
HLA-A 28	0,032	0,920	0,016	6	6	5,50	0,046
HLA-A 29	0,026	0,924	0,013	6	5	5,55	0,037
HLA-AW 30	0,006	0,934	0,003	2	1	1,87	0,405
HLA-AW 31	0,016	0,930	0,008	3	3	2,80	0,014
HLA-AW 32	0,034	0,920	0,017	9	7	8,26	0,192
Ii	0,009	0,932	0,004	1	1	0,93	0,005

TABELLE 17

Segregation von einzelnen Antigenen
in Familien der Größe 4 (4 Kinder)
Anzahl der Familien = 51

L o o s . B

Gen- frequenz	Erwartete Segregations- frequenz	h	Anzahl der positiven Familien	Anzahl der segr.Fam. (gezählt)	Anzahl der segr.Fam. (erwartet)	Chi Quadrat
HLA-B 5	0,059	0,030	10	9	9,09	0,009
HLA-B 7	0,155	0,084	15	15	13,00	0,301
HLA-B 8	0,108	0,057	18	16	15,90	0,006
HLA-B 12	0,118	0,063	15	12	13,20	0,105
HLA-B 13	0,043	0,020	8	7	7,33	0,015
HLA-B 14	0,029	0,015	5	5	4,62	0,031
HLA-BW 17	0,038	0,019	5	5	4,60	0,035
HLA-B 27	0,050	0,026	10	8	9,12	0,138
HLA-BW 35	0,082	0,043	7	7	6,28	0,083
HLA-BW 40	0,049	0,025	11	10	10,05	0,002
HLA-BW 15	0,062	0,032	11	10	10,00	0,000
HLA-BW 16	0,028	0,014	4	4	3,70	0,024
HLA-B 18	0,037	0,019	7	7	6,43	0,051
HLA-BW 21	0,020	0,011	4	4	3,70	0,024
HLA-BW 22	0,028	0,014	7	7	6,48	0,042
HLA-BW 37	0,008	0,004	2	2	1,87	0,009

TABELLE 18

Segregation von einzelnen Antigenen
in Familien der Größe 5 (5 Kinder)
Anzahl der Familien = 30

L o c u s A

Gen- frequenz	Erwartete Segregations- frequenz	h	Anzahl der positiven Familien	Anzahl der segr.Fam. (gezählt)	Anzahl der segr.Fam. (erwartet)	Chi- Quadrat
HLA-A 1	0,148	0,891	10	10	8,91	0,103
HLA-A 2	0,304	0,795	14	13	11,10	0,325
HLA-A 3	0,153	0,889	13	12	11,50	0,022
HLA-A 9	0,112	0,910	14	13	12,70	0,007
HLA-A 10	0,055	0,941	4	4	3,76	0,015
HLA-A 11	0,040	0,950	4	4	3,80	0,010
HLA-A 28	0,032	0,953	2	2	1,90	0,005
HLA-A 29	0,026	0,956	4	4	3,82	0,008
HLA-AW 30	0,006	0,966	0	0	-	-
HLA-AW 31	0,016	0,960	1	1	0,96	0,001
HLA-AW 32	0,034	0,952	4	4	3,80	0,010
Li	0,009	0,965	2	2	1,93	0,002

TABELLE 19

Segregation von einzelnen Antigenen
in Familien der Größe 5 (5 Kinder)
Anzahl der Familien = 30

Locus B

Gen- frequenz	Erwartete Segregations- frequenz	h	Anzahl der positiven Familien	Anzahl der sogr.Fam. (gezählt)	Anzahl der sogr.Fam. (erwartet)	Chi- Quadrat
HLA-B 5	0,059	0,948	5	5	4,75	0,013
HLA-B 7	0,155	0,896	8	8	7,15	0,100
HLA-B 8	0,108	0,924	10	10	9,24	0,063
HLA-B 12	0,118	0,916	7	6	6,40	0,056
HLA-B 13	0,043	0,958	4	4	3,82	0,085
HLA-B 14	0,029	0,965	5	5	4,82	0,067
HLA-BW 17	0,038	0,950	2	2	1,90	0,005
HLA-B 27	0,050	0,953	7	7	6,66	0,017
HLA-BW 35	0,082	0,936	8	7	7,50	0,033
HLA-BW 40	0,049	0,954	5	5	4,76	0,010
HLA-BW 15	0,062	0,946	6	5	5,70	0,085
HLA-BW 16	0,028	0,965	3	3	2,90	0,003
HLA-B 18	0,037	0,950	5	4	4,75	0,102
HLA-BW 21	0,020	0,968	3	2	2,90	0,280
HLA-BW 22	0,028	0,965	4	4	3,86	0,005
HLA-BW 37	0,008	0,974	1	1	0,97	0,001

TABELLE 20

Aufteilung der Haplotyp-Kombinationen

in Familien verschiedener Größe

Anzahl der Familien = 188

Muster der Haplotyp- verteilung bei den Kindern	Anzahl der Familien (beobachtet)	Anzahl der Familien (erwartet)	Chi-Quadrat
Familien, Größe 2			
2 0 0 0	7	11,7	1,89
1 1 0 0	40	35,3	0,63
Gesamt	47	47,0	2,52
Anzahl der Freiheitsgrade : 1 p = 0,12			
Familien, Größe 3			
3 0 0 0	6	3,7	1,34
2 1 0 0	30	33,8	0,43
1 1 1 0	24	22,4	0,14
Gesamt	60	60,0	1,91
Anzahl der Freiheitsgrade : 2 p = 0,40			
Familien, Größe 4			
4 0 0 0	$\boxed{3}$ 10	$\boxed{0,8}$ 10,4	0,01
3 1 0 0	$\boxed{7}$	$\boxed{9,6}$	
2 1 1 0	29	28,8	0,01
2 2 0 0	8	7,1	0,11
1 1 1 1	4	4,7	0,10
Gesamt	51	51,0	0,23
Anzahl der Freiheitsgrade : 3 p = 0,75			

TABELLE 20 (Fortsetzung)

Aufteilung der Haplotyp-Kombinationen

in Familien verschiedener Größe

Anzahl der Familien = 188

Muster der Haplotyp- verteilung bei den Kindern	Anzahl der Familien (beobachtet)	Anzahl der Familien (erwartet)	Chi-Quadrat
Familien, Größe 5			
5 0 0 0	0	0,1	
4 1 0 0	1 6	1,8 5,4	0,07
3 2 0 0	5	3,5	
2 2 1 0	10	10,6	0,03
3 1 1 0	3	7,0	2,28
2 1 1 1	11	7,0	2,28
Gesamt	30	30,0	4,66

Anzahl der Freiheitsgrade : 3
 $p = 0,19$

wenngleich deren Signifikanz mit steigender Zahl der Nachkommen abnimmt. Für die übrigen HLA-Antigene ließen sich in keiner Familiengruppe deutlich abweichende Werte nachweisen. Besonders gute Übereinstimmung zwischen Erwartungs- und Beobachtungswerten finden sich bei HLA-A29 und B5.

Ganz allgemein läßt sich feststellen, daß die Chi-Quadrat-Werte mit wachsender Familiengröße abnehmen, was einer zunehmend gleichmäßigen Aufteilung der Antigene auf die Nachkommen entspricht.

4)3)4) Aufteilung der Haplotyp-Kombination in Familien verschiedener Größe

Jedes Kind erhält von jedem Elternteil einen Haplotyp. Bezeichnet man die väterlichen Haplotypen mit a und b, die mütterlichen mit c und d, so gibt es bei der geschlechtlichen Vereinigung maximal vier Kombinationsmöglichkeiten: a/c; a/d; b/c; b/d. Zwei Kinder können sich in ihrem Haplotyp-Muster gleichen (z.B. beide a/c) oder sich in ihren Genotypen unterscheiden (z.B. Kind 1: a/c; Kind 2: b/d). Die Wahrscheinlichkeit für den ersten Fall beträgt 25%, für den zweiten 75%. Mit zunehmender Zahl der Nachkommen erhöht sich auch die Anzahl der Möglichkeiten für die Aufteilung dieser vier Haplotyp-Kombinationen auf die Kinder. So können bei Familien der Größe 3 entweder alle drei Kinder dieselben Haplotypen besitzen oder es gleichen sich nur zwei oder jedes hat einen anderen Genotyp. Natürlich ist nur bis zu vier Nachkommen die Möglichkeit gegeben, daß sich alle in den Genotypen unterscheiden. In größeren Familien muß sich eine bestimmte Anzahl von Kindern in ihren ererbten Haplotypen gleichen.

In Tabelle 20 sind unter "Muster der Haplotypverteilung bei den Kindern" die eben erklärten Möglichkeiten der Aufteilung bei entsprechender Kinderzahl, also das Vererbungsmuster zu finden. Die Nachkommen jeder Familie wurden auf die Übereinstimmung ihrer Genotypen überprüft. Danach konnten die betreffenden Familien entsprechend ihrer Größe und ihres Vererbungsmusters einer bestimmten Kategorie zugeteilt werden. Auf diese Weise lassen sich etwaige Korrelationen von Vererbungsmuster und Familiengröße erkennen.

Die Familien sind wieder in Größe 2-5 eingeteilt. Die Prozentzahl für die Berechnung der Erwartungswerte wurde nach dem von A l b e r t et al. 1973 (10) angegebenen Verfahren errechnet und auf vorliegende Familienzahlen angewandt. War die Zahl der beobachteten oder erwarteten Familien sehr gering, so wurden mehrere zusammengefaßt, um brauchbare Erwartungswerte zu erhalten.

In Familien der Größe 2, 3 und 4 war der Prozentsatz der genotypisch identischen Nachkommen durchweg höher als erwartet. Bei Größe 2 und 3 kommt dies auch in Chi-Quadrat-Werten von mehr als 1,0 zum Ausdruck. Allerdings muß hierbei die relativ geringe Probandenzahl in Rechnung gestellt werden. Eine signifikante Dominanz eines bestimmten Erbmodus ist somit nicht zu erkennen. Die p-Werte sind alle größer als 0,1, was den normalen Erbgang der Haplotypen unterstreicht.

4)3)5) Aufteilung von väterlichen und mütterlichen Haplotypen in Familien verschiedener Größe

Betrachtet man die Vererbung der väterlichen bzw. mütterlichen Haplotypen einzeln, so ergeben sich einfachere Vererbungsmuster als bei Tabelle 20. In Familien der

Größe 3 etwa sind nur zwei Möglichkeiten vorhanden: Entweder alle drei Kinder erben denselben väterlichen bzw. mütterlichen Haplotyp (= Vererbungsmuster 3 0) oder zwei Kinder gleichen sich in einem elterlichen Haplotyp, während das dritte Kind den anderen Haplotyp (z.B. b) geerbt hat (Vererbungsmuster 2 1).

Es ist nun denkbar, daß zwischen der Vererbung von paternalen und maternalen Haplotypen Unterschiede bestehen, zum Beispiel was die Häufigkeit der Segregation einer der beiden Vererbungseinheiten betrifft: Es könnte bevorzugt ein Haplotyp vererbt werden, seitens der Mutter oder des Vaters. Dies würde sich in einer Zunahme der Familien äußern, bei denen die Nachkommen bevorzugt einen der beiden möglichen Haplotypen eines Elternteils geerbt haben. Die Vererbungsmuster 2 0, 3 0 usw. müßten in diesem Falle öfter zu beobachten sein, als ihren Erwartungswerten entspräche. Weiterhin ist interessant, ob ein solches Verhalten, falls es festzustellen ist, eine bestimmte Familiengröße bevorzugt.

Wird eine gleichmäßige Segregation vorausgesetzt, so läßt sich die Zahl der "Familien - erwartet" folgendermaßen berechnen: Bei Familien der Größe 2 wird von den väterlichen (a und b) bzw. mütterlichen Haplotypen (c und d) mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% nur eine der beiden Vererbungseinheiten (a oder b; c oder d) an beide Kinder weitergegeben (Vererbungsmuster 2 0). In 50% der Fälle muß es eine gleichmäßige Aufteilung auf beide Kinder geben (Vererbungsmuster 1 1). Ein Kind hat dann a bzw. c, eines b bzw. d geerbt. Bei Familien Größe 3 verschiebt sich dieses Verhältnis zugunsten der Kombination 2 1 (75%), während bei 25% der Familien alle drei Nachkommen denselben väterlichen oder mütterlichen Haplotyp besitzen (3 0). Diese prozentuale Verschiebung setzt sich mit zunehmender Familiengröße gesetzmäßig fort, d.h. die Wahrscheinlichkeit, daß sich

TABELLE 21

Aufteilung von väterlichen und mütterlichen
Haplotypen in Familien verschiedener Größe
Anzahl der Familien = 188

Muster d.Haplo- typverteilung bei d.Kindern	Paternale Haplotypen			Maternale Haplotypen		
	Anz.d.Familien beob.	erw.	Chi- Quadr.	Anz.d.Familien beob.	erw.	Chi- Quadr.
Familien, Gr.2						
2 0	20	23,5	0,51	22	23,5	0,10
1 1	27	23,5	0,51	25	23,5	0,10
Gesamt	47	47,0	1,02	47	47,0	0,20
	Anz.d.Freiheitsgrade: 1 p = 0,5			Anz.d.Freiheitsgrade:1 p = 0,80		
Familien, Gr.3						
3 0	15	15,0	0,00	20	15,0	1,66
2 1	45	45,0	0,00	40	45,0	0,55
Gesamt	60	60,0	0,00	60	60,0	2,21
	Anz.d.Freiheitsgrade: 1 p = 1,0			Anz.d.Freiheitsgrade:1 p = 0,14		
Familien, Gr.4						
4 0	7	6,4	0,06	6	6,4	0,03
3 1	21	25,4	0,77	26	25,4	0,01
2 2	23	19,2	0,75	19	19,2	0,02
Gesamt	51	51,0	1,58	51	51,0	0,06
	Anz.d.Freiheitsgrade: 2 p = 0,45			Anz.d.Freiheitsgrade:2 p = 0,9		
Familien, Gr.5						
5 0	<u>0</u> 8	1,9 <u>11,2</u>	0,92	<u>2</u> 6	1,9 <u>11,2</u>	2,21
4 1	<u>8</u>	9, <u>3</u>		<u>4</u>	9, <u>3</u>	
3 2	22	18,8	0,54	24	18,8	1,44
Gesamt	30	30,0	1,46	30	30,0	3,65
	Anz.d.Freiheitsgrade: 1 p = 0,23			Anz.d.Freiheitsgrade:1 p = 0,05		

alle Nachkommen in den ererbten Haplotypen eines Eltern-
teils gleichen nimmt ab.

Bei den paternalen Haplotypen der Familiengröße 3 ergaben sich keinerlei Abweichungen von den Erwartungswerten (Tabelle 21). Bei den maternalen Haplotypen der Familien Größe 4, sind die Abweichungen minimal. Eine bemerkenswerte Diskordanz findet sich lediglich in den Familien mit fünf und mehr Nachkommen auf der maternalen Seite. Der p-Wert ist hier 0,05. Die zur Verfügung stehende Zahl der Familien war mit 30 dabei allerdings niedrig.

4)3)6) HLA-Identität von erstem und letztem Kind

Um eventuelle Selektionen im Zusammenhang mit wachsender Zahl der Nachkommenschaft erfassen zu können, wird schließlich noch die HLA-Identität von erstem und letztem Kind untersucht. Wenn die Auswahl der Haplotypen bei der Vererbung zufällig ist, so muß in 25% der Fälle eine Identität der Genotypen zwischen ältestem und jüngstem Kind vorliegen. Von den 188 Familien ist dies demnach bei 47 zu erwarten (siehe Tabelle 22).

Tatsächlich wurde eine Übereinstimmung bei 42 Familien gefunden. Am seltensten identisch waren erstes und letztes Kind bei der Familiengröße 3. Statt der 15 zu erwartenden Positiven wurden nur 10 gezählt (Chi-Quadrat 1,670). Der p-Wert von 0,38 bestätigt aber eine Haplotyp-Vererbung unabhängig von der Anzahl der Nachkommen.

Die obige Untersuchung (Tabelle 22) sowie die Prüfung der Segregation von paternalen und maternalen Haplotypen in Familien verschiedener Größe (Tabelle 21) und der Verteilung der Haplotyp-Kombinationen in Abhängigkeit von der Anzahl der Nachkommen (Tabelle 20) dienten ganz allgemein der Klärung der Frage nach der

TABELLE 22

HL-A - Identität von erstem und letztem
 (= jüngstem und ältestem) Kind

Anzahl der Familien = 188

Familiengröße	Anzahl der Positiven - - gezählt	Anzahl der Positiven - - erwartet	Chi-Quadrat
2 Kinder	10	11,7	0,246
3 "	10	15,0	1,670
4 "	16	12,8	0,800
5 "	6	7,5	0,300
Gesamt	42	47,0	3,016

Gesamt-Chi-Quadrat : 3,016

Anzahl d. Freiheitsgrade : 3

p = 0,38

Zufälligkeit der zygotischen Auswahl bei den HLA-Vererbungseinheiten. Die Ergebnisse zeigen im großen und ganzen gute Übereinstimmung mit den aufgrund obiger Annahmen postulierten Erwartungswerten. Eine normale zygotische Auswahl ohne Selektion wird dadurch bestätigt.

4)4) Bf-System

Im folgenden wurde der Bf-Faktor in ähnlicher Weise untersucht, wie es mit dem HLA-System in vorliegender Arbeit bereits geschehen ist. Auf die Beziehung dieses Properdinfaktors zum System der menschlichen Lymphozytenantigene wurde besonderer Wert gelegt. Von Professor R i t t n e r (74) konnten 100 Familien mit 400 Haplotypen auf Bf typisiert werden. Ein Großteil dieser Familien rekrutiert sich aus den 191 HLA-Familien, mit denen die bisherigen Untersuchungen durchgeführt worden waren.

4)4)1) Bf-Genfrequenzen

Ähnlich wie im HLA-System lassen sich von den vier möglichen Bf-Ausprägungsformen, S, F, S 1, F 1, die Genfrequenzen bestimmen. Die gefundenen Ergebnisse, in Tabelle 23 dargestellt, zeigen eine deutliche Dominanz von S. Seine Frequenz von 0,805 ist um ein Mehrfaches größer als die von F mit 0,180. S 1 und F 1 spielen mit jeweils 0,0075 eine untergeordnete Rolle.

TABELLE 23

Bf-Genfrequenzen als Fraktion von 1
(N = 100 Familien mit 400 Haplotypen)

Bf	Anzahl der Familien (gezählt)	Genfrequenz
F	72	0,1800
S1	3	0,0075
F1	3	0,0075
S	322	0,8050
		1,0000

4)4)2) Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Der Allelismus der Gene des Bf-Locus wird wieder mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts nachgewiesen. Es werden dabei die gezählten Häufigkeiten der möglichen Bf-Genkombinationen (ein Bf-Gen auf jedem der beiden homologen Chromosomen) mit den jeweiligen berechneten Werten verglichen (Tabelle 24). Die Formel für die Berechnung der Hetero- und Homozygoten finden sich auf S.

In Übereinstimmung mit der hohen Genfrequenz von S wird auch die Kombination S/S mit Abstand am häufigsten gefunden. Zusammen mit F/S macht sie über 90% der möglichen Bf-Genkombinationen aus. Die geringen Unterschiede zwischen Beobachtungs- und Erwartungswert verdeutlicht ein p-Wert von nahezu 1. Alle vier Bf-Typen sind somit wahrscheinlich Allele eines Locus.

4)4)3) Assoziation HLA-Bf

In Tabelle 25 und 26 wird die Beziehung des Bf-Locus zu den beiden Loci des HLA-Systems untersucht. Es wären positive oder negative Korrelationen mit bestimmten HLA-Antigenen denkbar. Also zum Beispiel ein gehäuftes Auftreten von A1 mit S etc. Um diese Frage zu klären, wurde mit Hilfe von 2 x 2-Tabellen nach signifikanten Assoziationen zwischen den Antigenen beider HLA-Loci und den Properdin-Genen gesucht. Als Beispiel sei die Assoziation von HLA-A1 mit Bf-F aufgeführt. Es bedeuten dabei:

+/+	:	A1/F	-/+	:	kein A1/F
+/-	:	A1/kein F	-/-	:	kein A1/kein F

Da die Assoziation mit F und S untersucht wurde, gibt es für jedes einzelne HLA-Antigen acht Möglichkeiten. In den beiden Tabellen sind diese rechts neben der betreffenden HLA-Spezifität aufgeführt. Es wurden sämtliche Antigene von Locus A und B berücksichtigt.

Zum besseren Verständnis der Berechnung des Gesamt-Chi-Quadrat-Wertes aus den vier Kombinationen +/+, +/-, -/+, -/- sei zuerst eine 2 x 2-Tabelle erläutert, wie sie in ähnlicher Form bereits zur Berechnung der Haplotyp-Frequenzen verwendet wurde.

	F	F	
A1	+/+ (a)	+/- (b)	C
A1	-/+ (c)	-/- (d)	D
	A	B	

A1 steht dabei als Beispiel für ein HLA-Antigen, F für ein Bf-Gen. a ist die Anzahl der Assoziationen von A1 mit F (+/+), b diejenige von A1 mit einem anderen Bf-Gen ausser F (+/-), c die Anzahl der Assoziationen von F mit einem HLA-Antigen ausser A1 (-/+) und d die Zahl der Chromosomen, bei denen weder A1 noch F enthalten ist. A steht für sämtliche Phänotypen mit F (= deren Anzahl), C für sämtliche Kombinationen mit A1. B bedeutet die Zahl aller Individuen, bei denen F nicht vorkommt, D entsprechendes für A1. Werden A und B bzw. C und D summiert, so ergibt sich mit N die Gesamtzahl der untersuchten Chromosomen.

Werte aus den entsprechenden 2 x 2-Tabellen werden nun für die Berechnung des oben erwähnten Gesamt-Chi-Quadrat-Wertes der jeweiligen HLA-Bf-Assoziation verwendet:

$$\text{Chi-Quadrat} = \frac{(a \cdot d - b \cdot c - \frac{N}{2})^2 \cdot N}{(a + c) \cdot (a + b) \cdot (c + d) \cdot (d + b)}$$

(Cavalli - Sforza)(24)

TABELLE 24

Anpassungstest nach dem Hardy-Weinberg-
 -Gleichgewicht für die Gene des Bf-Locus
 (N = 100 Familien mit 400 Haplotypen)

Art der Hetero- -bzw.Homozygoten	Anzahl der beobachteten	Anzahl der erwarteten	Chi-Quadrat
S/S	131	129,60	0,02
F/F	8	6,50	0,35
F/S	55	57,96	0,15
S/S1	3	2,42	0,07
S/F1	2	2,42	
F/F1	1	0,54	
S1/F1	0	0,02	
			0,59

Gesamt-Chi-Quadrat : 0,59

Anzahl der Freiheitsgrade : 3

p > 0,1

TABELLE 25

Assoziation : HLA—Bf
(N = 100 Familien mit 400 Haplotypen)
L o c u s A—Bf

HLA-A....	HLA-A.../F			Chi- Quadrat	HLA-A.../S			Chi- Quadrat
	+/+	+/-	-/-		+/+	+/-	-/+	
HLA-A 1	7	52	276	-1,31	52	7	270	2,03
HLA-A 2	19	101	227	0,36	101	19	221	-
HLA-A 3	20	51	277	5,24	48	23	274	-8,17
HLA-A 9	9	37	281	0,00	36	10	286	-
HLA-A 10	4	18	310	0,07	18	4	304	-
HLA-A 11	1	14	314	0,68	14	1	308	-
HLA-A 28	3	7	321	-	7	3	315	-
HLA-A 29	1	8	320	-	8	1	314	-
HLA-AW 30	4	8	320	-	7	5	315	-
HLA-AW 31	2	12	316	-	12	2	310	-
HLA-AW 32	-	-	-	-	-	-	-	-
Li	2	20	308	-	19	3	303	-
X								

TABELLE 26

Association : HLA---Bf
(N = 100 Familien mit 400 Haplotypen)
L o c u s B---Bf

HLA-B...	HLA-B.../F				Chi- Quadrat	HLA-B.../S				Chi- Quadrat
	+/+	+/-	-/+	-/-		+/+	+/-	-/+	-/-	
HLA-B 5	4	16	68	312	0,00	16	4	306	74	-
HLA-B 7	6	58	66	270	-3,18	58	6	264	72	4,24
HLA-B 8	1	41	71	287	-6,62	41	1	281	77	7,58
HLA-B 12	16	35	56	293	6,08	35	16	287	62	-4,42
HLA-B 13	3	17	69	311	0,00	17	3	305	75	-
HLA-B 14	1	9	71	319	0,06	9	1	313	77	-
HLA-BW 17	0	13	72	315	-1,82	13	0	309	78	2,10
HLA-B 27	1	24	71	304	-2,60	24	1	298	77	3,10
HLA-BW 35	15	22	57	306	12,40	22	15	300	63	-10,07
HLA-BW 40	2	17	70	311	-	17	2	305	76	-
HLA-BW 15	8	24	64	304	0,70	24	8	298	70	-
HLA-BW 16	1	9	71	319	0,00	9	1	313	77	-
HLA-B 18	6	12	66	316	2,01	11	7	311	71	-3,31
HLA-BW 21	0	9	72	319	0,00	6	3	316	75	-
HLA-BW 22	2	8	70	320	0,00	8	2	314	76	-
HLA-BW 37	2	0	70	328	-	0	2	322	76	-
X	4	14	68	314	-	12	6	310	72	-

$\frac{N}{2}$ wird dabei als sogenannte "Yates-Korrektur" bezeichnet. Besagte Chi-Quadrate wurden nur für die häufigen Assoziationen berechnet.

Für die Assoziation mit den Antigenen des Locus A ergaben sich für A3/S mit - 8,17 signifikant negative Chi-Quadrat-Werte. Deutlich positiv sind dieselben bei A3/F (5,24) - wie zu erwarten war. Bei Locus B treten eine ganze Reihe von Werten besonders hervor:

BW35/S	:	- 10,07	BW35/F	:	12,40
B8 /F	:	- 6,62	B8 /S	:	7,58
B12 /S	:	- 4,42	B12 /F	:	6,08
B18 /S	:	- 3,31	B7 /S	:	4,24
B7 /F	:	- 3,18	B27 /S	:	3,10

Die Bf-Gene sind somit mit gewissen HLA-Spezifitäten deutlich positiv (BW35/F; A3/F) bzw. negativ (BW35/S; A3/S) korreliert.

4)4)4) HLA-Bf-Haplotypfrequenzen

Für die positiven HLA-Bf-Assoziationen (+/+) lassen sich - wenn man ein HLA-Antigen in Gemeinschaft mit einem Bf-Gen als Vererbungseinheit betrachtet - sogenannte HLA-Bf-Haplotypfrequenzen berechnen. Dabei sind diesmal auch die seltenen Bf-Spezifitäten S1 und F1 berücksichtigt.

Aus Tabelle 27 und 28 ist ersichtlich, daß der "Haplo-
typ" A2/S mit einer "Haplotypfrequenz von 0,2525 am häufigsten angetroffen wurde. Aufgrund der hohen Genfrequenzen von A2 und S war dies zu erwarten. Über 0,1 liegen nur noch B7/S (0,1450), A1/S (0,1300), A3/S (0,1200) und B8/S (0,1025). Wesentlich seltener sind natürlich die Haplotypen mit F. Hier dominiert A2/F mit 0,0475, also einer immerhin fünfmal geringeren

TABELLE 27

HLA—Bf - Haplotypfrequenzen
(N = 100 Familien mit 400 Haplotypen)

L o c u s A — Bf

	HLA-A.../F		HLA-A.../S		HLA-A.../S1		HLA-A.../F1	
	Anzahl der Positiven (gezählt)	Haplotyp- frequenz	Anzahl der Positiven (gezählt)	Haplotyp- frequenz	Anzahl der Positiven (gezählt)	Haplotyp- frequenz	Anzahl der Positiven (gezählt)	Haplotyp- frequenz
HLA-A 1	7	0,0175	52	0,1300	0	-	0	-
HLA-A 2	19	0,0475	101	0,2525	0	-	0	-
HLA-A 3	20	0,0500	48	0,1200	1	0,0025	2	0,0050
HLA-A 9	9	0,0225	36	0,0900	1	0,0025	0	-
HLA-A 10	4	0,0100	18	0,0450	0	-	0	-
HLA-A 11	1	0,0025	14	0,0350	0	-	0	-
HLA-A 28	3	0,0075	7	0,0175	0	-	0	-
HLA-A 29	1	0,0025	8	0,0200	0	-	0	-
HLA-AW 30	4	0,0100	7	0,0175	1	0,0025	0	-
HLA-AW 31								
HLA-AW 32	2	0,0050	12	0,0300	0	-	0	-
Li1	-	-	-	-	-	-	-	-
X	2	0,0050	19	0,0475	0	-	1	0,0025

TABELLE 28

HLA-Bf - Haplotypfrequenzen
(N = 100 Familien mit 400 Haplotypen)

Locus B-Bf

	HLA-B.../F		HLA-B.../S		HLA-B.../S1		HLA-B.../F1	
	Anzahl der Positiven (gezählt)	Haplotyp- frequenz	Anzahl der Positiven (gezählt)	Haplotyp- frequenz	Anzahl der Positiven (gezählt)	Haplotyp- frequenz	Anzahl der Positiven (gezählt)	Haplotyp- frequenz
HLA-B 5	4	0,0100	16	0,0400	0	-	0	-
HLA-B 7	6	0,0150	58	0,1450	0	-	0	-
HLA-B 8	1	0,0025	41	0,1025	0	-	0	-
HLA-B 12	16	0,0400	35	0,0875	0	-	0	-
HLA-B 13	3	0,0075	17	0,0425	0	-	0	-
HLA-B 14	1	0,0025	9	0,0225	0	-	0	-
HLA-BW 17	0	-	13	0,0325	0	-	0	-
HLA-B 27	1	0,0025	24	0,0600	0	-	0	-
HLA-BW 35	15	0,0375	22	0,0550	0	-	0	-
HLA-BW 40	2	0,0050	17	0,0425	0	-	0	-
HLA-BW 15	8	0,0200	24	0,0600	0	-	0	-
HLA-BW 16	1	0,0025	9	0,0225	0	-	0	-
HLA-B 18	6	0,0150	11	0,0275	0	-	1	0,0025
HLA-BW 21	0	-	6	0,0150	3	0,0075	0	-
HLA-BW 22	2	0,0050	8	0,0200	0	-	0	-
HLA-BW 37	2	0,0050	0	-	0	-	0	-
X	4	0,0100	12	0,0300	0	-	2	0,0050

Frequenz als A2/S! Die Haplotypen, die S1 oder F1 beinhalten, entsprechen in ihrer Frequenz der Seltenheit dieser beiden Bf-Spezifitäten.

4)4)5) Frequenzen von ausgewählten HLA-Bf-Haplotypen
mit zugehörigen Delta-Werten

Analog zu den HLA-Haplotypen könnte auch bei den HLA-Bf-Zweipunkt-Haplotypen ein Kopplungsungleichgewicht bestehen. Ein Maß dafür ist der Delta-Wert. Auf seine Berechnung wurde bereits in einem früheren Kapitel ausführlich eingegangen. Für Haplotypen, bei denen aufgrund der zugehörigen Genfrequenzen signifikante Delta-Werte zu erwarten waren, wurden dieselben berechnet (Tabelle 29).

Für die fünf ausgewählten HLA-Bf-Spezifitäten ergaben sich durchweg Werte über 0,01. Bei BW35/F ist der Delta-Wert am höchsten (0,021). Allerdings sind diese Kopplungsungleichgewichte nicht so hochgradig wie beispielsweise bei dem HLA-Haplotyp A1 - B8 (0,0730).

4)4)6) HLA-Bf-Dreipunkt-Haplotypen mit
zugehörigen Delta-Werten

Locus A und B des HLA-Systems und der Bf-Locus liegen dicht beieinander auf dem Chromosom Nr.6, werden gemeinsam vererbt und deshalb auch als Dreipunkt-Haplotyp bezeichnet. Das Zusammentreffen eines bestimmten Bf-Gens mit irgendeinem Antigen des HLA-Systems ist bei regelrechtem Erbgang dem Zufall überlassen. Wie bereits besprochen, treten bei einigen HLA-Haplotypen

TABELLE 29

Frequenzen von ausgewählten
HLA—Bf - Haplotypen mit den zugehörigen
Delta-Werten

HLA / Bf	Haplotyp- frequenz	Delta- Wert
HLA-A 3 / F	0,050	0,018
HLA-B 7 / S	0,145	0,016
HLA-B 8 / S	0,103	0,018
HLA-B 12 / F	0,040	0,017
HLA-BW 35 / F	0,038	0,021

Kopplungsungleichgewichte auf, ebenso zwischen einzelnen HLA-Antigenen und Bf-Genen (Tabelle 29). Es ist deshalb auch für die Dreipunkt-Haplotypen HLA-A-B-Bf ein solches Ungleichgewicht wahrscheinlich.

Für die häufigsten HLA-Haplotypen wurde deshalb zunächst ihre Assoziation mit den Genen des Properdin-Systems untersucht, indem die Frequenzen dieser Dreipunkt-Haplotypen aus den gezählten Werten bestimmt wurden. Die folgende Berechnung der Delta-Werte soll am Beispiel der Dreipunkt-Haplotypen A3 - B7 - S erläutert werden:

Allgemein ergibt sich der Delta-Wert für einen aus zwei benachbarten Genen zusammengesetzten Haplotyp als:

$$\text{Delta}_{e-f} = h_{e-f} - g_e \cdot g_f$$

In unserem Falle muß der Delta-Wert des Dreipunkt-Haplotyps aus den Delta-Werten der entsprechenden Zweipunkt-Haplotypen zusammengesetzt werden:

(P i a z z a (68))

$$\begin{aligned} \text{Delta A3 - B7} &= h_{A3-B7} - g_{A3} \cdot g_{B7} = 0,0625 - \\ 0,177 \cdot 0,16 &= 0,03418 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Delta A3 - S} &= h_{A3-S} - g_{A3} \cdot g_S = \\ = 0,12 - 0,177 \cdot 0,805 &= 0,022485 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Delta B7 - S} &= h_{B7-S} - g_{B7} \cdot g_S = \\ = 0,145 - 0,16 \cdot 0,805 &= 0,0162 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Delta A3 - B7 - S} &= h_{A3-B7-S} - g_{A3} \cdot g_{B7} \cdot g_S - \\ - \text{Delta}_{A3-B7} \cdot g_S &+ \text{Delta}_{A3-S} \cdot g_{B7} - \text{Delta}_{B7-S} \cdot g_{A3} = \\ = 0,0575 - 0,177 \cdot 0,16 \cdot 0,805 &- 0,03418 \cdot 0,805 + \\ + 0,022485 \cdot 0,16 - 0,0162 \cdot 0,177 &= 0,0079 \end{aligned}$$

$$\text{Delta A3-B7-S} = 0,0079$$

TABELLE 30

Häufigste HLA—Bf - Dreipunkt-Haplotypen
mit den zugehörigen Delta-Werten
(N = 100 Familien mit 400 Haplotypen)

HLA-A.../B—Bf	Anzahl der Haplotypen (gezählt)	Haplotyp- frequenz	Delta-Wert
HLA-A1 / B 8—S	35	0,0875	0,0112
HLA-A3 / B 7—S	23	0,0575	0,0079
HLA-A2 / B12—S	17	0,0425	-0,0027
HLA-A2 / B 7—S	13	0,0325	-0,0232
HLA-A2 / B27—S	11	0,0275	0,0018
HLA-A2 / B12—F	7	0,0175	0,0020
HLA-A3 / BW35—F	5	0,0125	0,0022

Bemerkenswerte Kopplungsungleichgewichte ergaben sich lediglich für A2-B7-S (- 0,0232) und A1-B8-S (0,0112). Die weiteren Werte sind in Tabelle 30 nachzulesen.

4)5) PGM₃

46 Familien wurden neben dem HLA-System zusätzlich auf die Ausprägung des Gens für das Enzym Phosphoglucosemucase 3 getestet. Von den 184 Chromosomen der Eltern fand sich auf 139 die Variante PGM₃-1, bei 45 PGM₃-2. Diese Werte ergeben folgende Genfrequenzen:

PGM₃-1 : 0,755

PGM₃-2 : 0,245

Für die Phänotypen wurden ermittelt:

Genotyp	Anzahl d. Positiven (beobachtet)	Anzahl d. Positiven (erwartet)
PGM ₃ 1/1	54	52
" 2/1	36	34,5
" 1/2	2	5,5
" 2/2	<u>2</u>	<u>5,5</u>
	92	92,0

Die Genotypen 1/1 und 2/2 treten phänotypisch als 1 und 2 in Erscheinung. Ihre Werte können deshalb auch für die Zahl der Phänotypen benutzt werden. Für die "Anzahl der Positiven (beobachtet)" von 1,2 addiert man die gezählten Werte der Genotypen 2/1 und 1/2, da ja der Phänotyp 1,2 beide Möglichkeiten beinhaltet. Zur Berechnung der Erwartungswerte werden die Phänotypfrequenzen mit der Anzahl der Personen multipliziert. Während für PGM₃-1 und 1,2 die durch Zählung ermittelten Werte mit den Erwartungswerten gut übereinstimmen, ergibt sich für PGM₃-2 ein deutlicher Unterschied, der jedoch in Anbetracht der Probengröße zufallsbedingt sein dürfte.

4)6) Rekombinationen

Aufgrund der Bedeutung von Rekombinationen - in der Einleitung wurde bereits darauf eingegangen - erschien es wichtig, das vorhandene Material an Familien auch darauf zu untersuchen. In Tabelle 31 ist jede der Familien, bei denen ein crossing over festgestellt wurde, aufgrund der Seltenheit des Ereignisses einzeln aufgeführt. Das durch die Segregationsanalyse bestimmte crossing over bei einem paternalen oder maternalen Chromosomenpaar wurde in der Tabelle durch das Zeichen $\sqcap$ bzw. $\sqcup$ symbolisiert. a, b, c und d bezeichnen wieder die beiden väterlichen (a, b) und mütterlichen (c, d) Chromosomen bzw. Haplotypen. Eine zusätzliche Typisierung einer der Familien auf PGM₃ (Fam.Leipold) oder Bf (Fam.Karcher) wurde berücksichtigt.

4)6)1) Rekombinationen im HLA-System

Unter den 191 HLA-typisierten Familien befanden sich 6 mit Rekombinationen. Das entspricht einer Rekombinationsfraktion von 3,1%, oder, da 191 Familien gleich 382 Eltern, 1,55% Rekombinationsfraktion der Einzelpersonen bzw. 0,8% der Haplotypen.

Vier der sechs crossing overs wurden bei mütterlichen, zwei bei väterlichen Chromosomen beobachtet. Dreimal wurde auf die Rekombination mit Hilfe des Genotyps des ersten Kindes geschlossen, je einmal mittels Kind 2, 3 und 4. Somit vererbten die Eltern am häufigsten dem ersten Kind den rekombinanten Haplotyp. Bei einer Zahl von nur sechs Rekombinanten ließen sich natürlich keine für ein crossing over besonders disponierte Haplotypen nachweisen.

TABELLE 31

Rekombinationen

Familie F i n k e

Vater	Mutter
Möglichkeit I:	
— A 2 — B 12 — (a)	— A 3 — B 7 — (c)
— A 28 — BW 35 — (b)	— A 3 — BW 17 — (d)

Möglichkeit II:

— A 2 — BW 35 — (a)
— A 28 — B 12 — (b)

Bei Möglichkeit I liegt bei Kind 1 (Uwe)
ein crossing over der väterlichen Haplotypen vor:

Kind 1 (Uwe):	— A 28 — B 12 — (a . b)
	— A 3 — B 7 —

d.f. crossing over	— A 2 — — B 12 —
beim Vater:	— A 28 — — BW 35 —

Bei Möglichkeit II liegt bei Kind 2 (Astrid)
ein crossing over der väterlichen Haplotypen vor:

Kind 2 (Astrid):	— A 2 — B 12 — (a . b)
	— A 3 — B 7 —

d.f. crossing over	— A 2 — — BW 35 —
beim Vater:	— A 28 — — B 12 —

TABELLE 31 (Fortsetzung)

Rekombinationen

Familie K a r c h e r

Vater					Mutter				
—	A 2	—	BW 35	— S — (a)	—	A 1	—	B 8	— S — (c)
—	A 3	—	B 27	— S — (b)	—	A 11	—	BW 35	— S — (d)

Bei Kind 4 (Bernhard) crossing over der mütterlichen Haplotypen

Kind 4 (Bernhard):	—	A 2	—	BW 35	— S — (a)
	—	A 1	—	BW 35	— S — (c . d)

d.f. crossing over bei	—	A 1	—	---	B 8	— S —
der Mutter:	—	A 11	---	└	BW 35	— S —

Kind 1 (Eva-Maria):	—	A 3	—	B 27	— S — (b)
	—	A 11	—	BW 35	— S — (d)

Kind 2 (Elisabeth):	—	A 2	—	BW 35	— S — (a)
	—	A 1	—	B 8	— S — (c)

Kind 3 (Christine):	—	A 2	—	BW 35	— S — (a)
	—	A 1	—	B 8	— S — (c)

TABELLE 31 (Fortsetzung)

Rekombinationen

Familie L e i p o l d

Vater					Mutter				
— A 28 —	BW 40	----	1 —	(a)	— A 2 —	B 18----	1 —	(c)	
— X —	B 14	----	1 —	(b)	— A 9 —	BW22----	1 —	(d)	

Bei Kind 3 (Roman) crossing over der
väterlichen Haplotypen:

Kind 3 (Roman): — A 28 — B 14 ---- 1 — (a . b)
 — A 2 — B 18 ---- 1 — (c)

d.f. crossing over
beim Vater: — A 28 — — — — BW 40 ---- 1 —
 — X — — — — B 14 ---- 1 —

Kind 1 (Birgit): — X — B 14 ---- 1 — (b)
 — 2 — B 18 ---- 1 — (c)

Kind 2 (Monika): — A 28 — BW 40 ---- 1 — (a)
 — A 9 — BW 22 ---- 1 — (d)

Kind 4 (Iris): — A 28 — BW 40 ---- 1 — (a)
 — A 9 — BW 22 ---- 1 — (d)

TABELLE 31 (Fortsetzung)

Rekombinationen

Familie W i e l a n d

Vater					Mutter			
— A 3 —	B 7 —	(a)			— A 1 —	BW 17 —	(c)	
— A 9 —	BW 22 —	(b)			— A 2 —	BW 37 —	(d)	

Bei Kind 2 (Michael) crossing over der mütterlichen Haplotypen:

Kind 2 (Michael): — A 9 — BW 22 — (b)
 — A 1 — BW 37 — (c . d)

d.f. crossing over bei der Mutter: — A 1 — — — BW 17 —
 — A 2 — — — BW 37 —

Kind 1 (Andreas): — A 3 — B 7 — (a)
 — A 2 — BW 37 — (d)

Kind 3 (Thomas): — A 3 — B 7 — (a)
 — A 1 — BW 17 — (c)

Kind 4 (Markus): — A 9 — BW 22 — (b)
 — A 2 — BW 37 — (d)

TABELLE 31 (Fortsetzung)

Rekombinationen

Familie P ö p p e l

Vater	Mutter
— A 10 — B 7 — (a)	— A 1 — BW 17 — (c)
— A 10 — B 8 — (b)	— A 2 — B 12 — (d)

Bei Kind 1 (Maria) crossing over der
mütterlichen Haplotypen:

Kind 1 (Maria): — A 10 — B 7 — (a)
— A 2 — BW 17 — (c . d)

d.f. crossing over — A 1 — — — BW 17 —
bei der Mutter: — A 2 — — — B 12 —

Kind 2 (Regina): — A 10 — B 7 — (a)
— A 1 — BW 17 — (c)

Kind 3 (Gertrud): — A 10 — B 8 — (b)
— A 2 — B 12 — (d)

4)6)2) Rekombinationen zwischen HLA-B und Bf

Rekombinationen sind nicht nur zwischen den beiden HLA-Loci sondern auch zwischen Locus B und dem Bf-Locus zu erwarten. Tatsächlich konnten bei einer Probengröße von 44 Familien vier rekombinante Familien gefunden werden. Die Seltenheit des Ereignisses spricht für eine geringe Entfernung zwischen beiden Loci. Es ist anzunehmen, daß noch einige crossing overs mehr stattfanden, die aber aufgrund der Homozygotie der betreffenden Personen nicht feststellbar waren. Homozygotie auf Bf-S (S/S) zum Beispiel ist sehr häufig zu beobachten. Ganz allgemein ist die Rate der Homozygoten beim Properdin-System, in Übereinstimmung mit dem wesentlich geringeren Polymorphismus der Bf-Gene viel höher als beim HLA-System.

4)6)3) Rekombinationen zwischen HLA-B und PGM₃

Bei PGM₃ wurden bei 92 Eltern immerhin 20 Rekombinationen gezählt. Diese hohe Rekombinationsfrequenz ist ein wichtiger Hinweis auf eine relativ große Entfernung zwischen HLA-B und dem PGM₃-Locus. Nimmt man wie oben an, daß auch die Zahl der Homozygoten noch einige crossing overs enthält, so beträgt der Anteil der Rekombinanten zwischen Locus B und dem Locus für PGM₃ etwa 25%.

5) DISKUSSION

Bei Familienanalysen lassen sich mit Hilfe des HLA-Musters der Kinder - bestimmt mittels einer der angegebenen Methoden - sehr gut Rückschlüsse auf die Genotypen der Eltern ziehen. Die Individuen können auf diese Weise wesentlich genauer genotypisch in Bezug auf HLA charakterisiert werden als dies in unverwandten Populationen möglich ist. Für das hochpolymorphe System HLA ist dies von besonderer Bedeutung. Die Untersuchung einer genügend umfangreichen Zahl von Eltern unverwandter Familien gibt somit einen repräsentativen Querschnitt der Verteilung der HLA-Haplotypen in der Bevölkerung. Voraussetzung bei den untersuchten Familien ist natürlich das Fehlen von Erbkrankheiten oder Krankheiten, die als HLA-assoziiert identifiziert wurden.

Wie erwähnt ist für einige Krankheiten eine positive Korrelation mit bestimmten HLA-Antigenen nachgewiesen (siehe Einleitung). Es wäre denkbar, daß die HLA-Typisierung - bei der Entdeckung weiterer positiver Korrelationen - zu Frühdiagnostik herangezogen würde. Diese müßte eine sehr genaue HLA-Bestimmung, also mittels Familienanalyse, zur Grundlage haben.

Darüber hinaus könnte die Untersuchung der Gen- und Haplotypfrequenzen des HLA-Systems wichtige Hinweise auf eventuell zu erwartendes gehäuftes Auftreten von HLA-abhängigen Krankheiten geben. Dies nicht nur im Einzelfall, sondern auch unter Umständen bei ganzen Bevölkerungsgruppen. So fanden sich beispielsweise Anzeichen dafür, daß HLA-A1 und A8 bei Coeliakie-Patienten gehäuft auftreten (H a r m s et al. (47), A s q u i t h (17)). Interessant ist, daß A8 als

typisches HLA-Antigen der kaukasischen Bevölkerung (A l b e r t et al. (8) in Ländern mit überdurchschnittlich häufigem Auftreten von Coeliakie (Irland, Großbritannien, Australien) ebenfalls gehäuft anzutreffen ist (M c C a r t h y et al. (55)).

Weiterhin ist bemerkenswert, daß die Coeliakie in Populationen mit sehr niedriger Frequenz von A8 (Punjab, Westpakistan) praktisch nicht beobachtet werden konnte (M c N e i s h et al. (56)).

Diese Erkenntnisse legen den Schluß nahe, daß die vermehrte Anwesenheit von HLA-A8 in einer Bevölkerung ein Hinweis auf eine gewisse Prädisposition für Coeliakie ist. Entsprechende Überlegungen über dieses Beispiel hinaus für weitere HLA-assoziierte Krankheiten bieten sich an.

5)1) Ableitung von Gen- und Haplotypfrequenzen, Hardy-Weinberg-Gleichgewicht sowie Kopplungs- ungleichgewicht

Bei den Genfrequenzen der bisher bekannten HLA-Antigene ergaben sich keine wesentlichen Abweichungen im Vergleich mit vorangegangenen Untersuchungen

(A l b e r t et al. (10); E g o r o v et al. (41). So treten zum Beispiel bei unserer heimischen Bevölkerung die Antigene HLA-A2 und B7 am häufigsten auf.

Der Test des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts ergab eine gute Übereinstimmung mit Ausnahme von A11, was wohl auf serologische Schwierigkeiten bei der Bestimmung dieses Antigens hinweist. Der Hardy-Weinberg-Test in früheren Untersuchungen (A l b e r t (5), (10)) brachte ebenfalls eine befriedigende Konkordanz mit den Erwartungswerten. Aber auch hier traten Abweichungen bei A11 auf.

Haplotypen und Delta-Werte geben ein für die europäische Bevölkerung charakteristisches Bild mit einer Häufung von: HLA-A1 - B8; A3 - B7; A2 - B12; A2 - B7; A2 - BW15; A2 - BW40 und A3 - BW35. Die Reihenfolge entspricht dabei der Häufigkeit. Interessant ist hier ein Vergleich mit einer 1973 verfaßten Studie von A l b e r t et al. (10) an 535 Familien:

Studie 1973			Ergebnisse vorl.Arbeit	
Haplotyp	Haplotyp- frequenz	Delta- -Wert	Haplotyp- frequenz	Delta- -Wert
HLA-A1 - B8	0,069	+0,056	0,089	+0,073
" A2 - B12	0,066	+0,019	0,051	+0,015
" A3 - B7	0,052	+0,037	0,062	+0,038
" A2 - B7	0,038	NS	0,039	-0,008
" A2 - BW15	0,031	+0,019	0,027	+0,008
" A2 - BW40	0,030	+0,010	0,025	+0,010

In vorliegender Arbeit ergab sich für den dominierenden Haplotyp HLA-A1 - B8 eine noch höhere Frequenz als in der Studie von 1973. Ebenso ist A3 - B7 stärker vertreten und liegt in der Reihenfolge der Häufigkeit an zweiter Stelle, im Gegensatz zu den Ergebnissen von 1973, wo A3 - B7 erst hinter dem Haplotyp A2 - B12 zu finden ist. A2 - B12 weist bei uns eine deutlich niedrigere Frequenz auf. Die Werte für die übrigen Haplotypfrequenzen dagegen entsprechen einander weitgehend.

Die Diskrepanz zwischen den aufgrund der Genfrequenzen der beteiligten Antigene zu erwartenden Werten und den tatsächlich mittels Zählung bestimmten Haplotypfrequenzen, objektiviert mittels Delta-Wert, ist für einige Haplotypen recht groß: A1 - B8; A3 - B7; A2 - B8 - in quantitativer Reihenfolge. Die hohen Delta-Werte für die genannten Haplotypen zeigen ein charakteristisches Kopplungsungleichgewicht an. In der oben erwähnten

Studie besitzen A1 - B8 und A3 - B7 ebenfalls hohe Delta-Werte, nicht jedoch A2 - B8. Die Ursache für das Kopplungsungleichgewicht der genannten Haplotypen ist bisher nicht bekannt (A l b e r t (10)). B o d m e r (22) und M a t t i u z et al. (52) vermuten, daß der Ursprung der fraglichen Haplotypen jüngeren Datums ist, sodaß ein Ausgleich mittels crossing over noch nicht stattfinden konnte. Andererseits könnte auch Selektion dafür verantwortlich sein.

Die Haplotypfrequenzen wurden für die häufigen Haplotypen zusätzlich durch Berechnung aus den Phänotypdaten bestimmt. Zwischen Haplotypzählung und -berechnung ergaben sich keine großen Differenzen, wenngleich die Übereinstimmung nicht so gut ist wie bei den Genfrequenzen.

Zieht man Vergleiche mit dem HLA-Antigen- und Haplotypmuster anderer Populationen, so ergeben sich zum Teil wesentliche Unterschiede:

Untersuchungen an der türkischen Bevölkerung beispielsweise (A l b e r t et al. (9) zeigen eine niedrigere Frequenz für A1, B7, B8, BW40 und BW15, während etwa A5, A9 und BW22 eine wesentlich höhere Antigenfrequenz aufweisen als die hier untersuchte Population. Noch deutlichere Unterschiede bestehen auf der Ebene der Haplotypen. Die charakteristischen Haplotypen der weißen kaukasischen Bevölkerung (zu der auch vorliegende Münchener Population zählt): A1 - B8; A2 - B12; A3 - B7 sind bei den Türken nur sehr schwach repräsentiert, während A3 - BW21 für die türkische Bevölkerung typisch zu sein scheint.

Ganz allgemein sind Unterschiede bezüglich des HLA-Systems zwischen verschiedenen Populationen bei den Haplotypfrequenzen viel ausgeprägter als bei den HLA-Genfrequenzen (A l b e r t et al. (8)), sodaß eine Bevölkerung mit Hilfe der Haplotypfrequenzen

unter Umständen charakterisiert werden kann. Für die Ermittlung der genetischen Distanz zwischen Volksgruppen oder Bevölkerungen kann dies natürlich bedeutungsvoll werden. So ergaben sich zum Beispiel für Sherpas und Japaner im Vergleich mit Münchener Kaukasiern - unter Zugrundelegung der jeweiligen Haplotypfrequenzen - große genetische Distanzen. Zu den Indern wiederum bestehen interessanterweise nur geringe Unterschiede, was in weniger ausgeprägtem Maße auch für die türkische Bevölkerung zutrifft (A l b e r t et al. (8, 9)).

Inwieweit obige Beispiele in Zusammenhang mit Völkerwanderungen etc. gebracht werden können, wird davon abhängen, ob die Brauchbarkeit der HLA-Typisierung für ethnologische Untersuchungen bewiesen werden kann.

5)2) Segregationsanalyse

Es ist vorstellbar, daß selektive Vorgänge, sowohl auf der Ebene der Zygote als auch im späteren Leben zur Bevorzugung gewisser HLA-Antigenmuster beitragen (A l b e r t (10); B o d m e r (22); und M a t t i u z (52)). Eine während der Konzeption stattgefundene Auswahl läßt sich mit Hilfe von Segregationsanalysen weitgehend bestätigen bzw. ausschließen, vorausgesetzt, die Anzahl der untersuchten Nachkommen der betreffenden Familie ist groß genug. Präferenzen im Zusammenhang mit dem Geschlecht müssen ebenfalls berücksichtigt werden, wenngleich die HLA-Antigene nicht auf den Geschlechtschromosomen lokalisiert sind und somit eine direkte geschlechtsgebundene Vererbung nicht in Frage kommt. Es könnten jedoch durch bisher noch unbekannte Mechanismen gewisse HLA-Antigene oder -Haplotypen von einem Geschlecht bevorzugt werden.

Allgemein läßt sich feststellen, daß mit dieser doch relativ groben Methode keine signifikanten Abweichungen beobachtet werden konnten. Dies schließt jedoch nicht aus, daß selektive Prozesse im Laufe des späteren Lebens an irgendeiner Stelle ansetzten und eine Auswahl trafen, die sich, wie bereits festgestellt, im gehäuf-ten Auftreten bestimmter HLA-Antigene, zum Beispiel A2, äußert (A l b e r t (10); S n e l l et al. (81)). Eine bevorzugte Segregation bestimmter Haplotypen liegt ebenfalls im Bereich des Möglichen und bedarf der Untersuchung. Läge eine derartige Auswahl vor, so wären Konsequenzen in Bezug auf den Mechanismus der Vereinigung von Eizelle und Spermium zu erwarten: Es wäre beispielsweise vorstellbar, daß der mütterliche Organismus durch mehrere Geburten für eine der beiden haploiden Expressionen von HLA auf dem Spermium sensibilisiert wird und somit eine Selektion auf der Ebene der Konzeption erfolgt, gesteuert durch mütterliche Antikörper. Umgekehrt ließe sich - im Gegensatz zu der eben dargestellten zygotischen Auswahl - eine spermatogene, HLA-orientierte Auswahl denken, bei der gewisse HLA-Antigene auf die Samenzelle hemmend wirken.

Weder in der Segregationsanalyse nach Familiengröße noch im Vergleich des HLA-Musters von erstem und letztem Kind ließen sich signifikante Anhaltspunkte für eine solche maternale oder paternale Selektion finden. Bei Zutreffen einer der beiden obigen Theorien müßte außerdem das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht verschoben sein, was ebenfalls nicht nachweisbar ist.

5)3) Polymorphismus des HLA-Systems

Alle bisherigen Ergebnisse unterstreichen den extremen Polymorphismus des HLA-Systems. Selektionen einzelner Antigene oder Haplotypen konnten nur in wenigen Fällen nachgewiesen werden und sind bei der Vielfalt der Leukozytenantigene sicher zufallsbedingt. Daraus ergibt sich die Frage nach dem Sinn eines solchen Polymorphismus. Sie kann nur mit einem Vorteil der Heterozygoten gegenüber den Homozygoten beantwortet werden, wenngleich dies natürlich nicht zu beweisen ist. Existiert dennoch, wie in vorliegender Arbeit vermutet, eine am HLA-System angreifende Selektion, so muß sie im Verlauf des späteren Lebens erfolgt sein.

Eine Selektion wäre vorstellbar, die eine Assoziation bestimmter HLA-Antigene mit gewissen Erkrankungen als Grundlage hätte: So könnten in früherer Zeit große Seuchen eine Auswahl bewirkt haben; einfach dadurch, daß die erkrankten Individuen - als Träger eines mit dieser Erkrankung assoziierten HLA-Antigens - durch ihren Tod die Häufigkeit dieses Antigens verminderten. Umgekehrt wäre es ebenso denkbar, daß die Besitzer eines bestimmten Haplotyps einen besonderen Schutz vor der Erkrankung aufweisen und damit die Frequenz dieses Antigens erhöhen.

Wenn andererseits, durchaus möglich, Immunantwortgene mit dem HLA-Genort gekoppelt und mit einzelnen Allelen assoziiert wären, so bedeutete eine Heterozygotie für HLA zugleich eine Erweiterung des Immunantwortspektrums. Das ergäbe einen biologischen Vorteil, der die Entstehung eines Polymorphismus erklären könnte.

Der Polymorphismus des HLA-Systems deutet an, daß Mutationen, die zu antigenen Unterschieden führen, für die Funktion des Moleküls wohl unerheblich, vielleicht sogar von Vorteil sind. Ein Vergleich mit den Immun-

globulinen bietet sich an: Die Spezifität der antigenbindenden Gruppe beruht hier auf einer spezifischen Reihenfolge der Aminosäuren im variablen Teil des Immunglobulinmoleküls, wo multiple Mutationen zur Diversifikation erforderlich sind. Die Möglichkeit der Änderung dieser Reihenfolge ohne Verlust der spezifischen Eigenschaften der betreffenden Immunglobulinklasse (festgelegt im konstanten Teil des Moleküls) bedingt eine große strukturelle Heterogenität und somit einen sehr ausgeprägten Polymorphismus. Letzteres befähigt die Immunglobuline, auf eine ausgedehnte Anzahl ganz unterschiedlicher antigenen Reize adäquat zu reagieren. Am konstanten Teil sind Mutationen ohne Funktionsverlust dagegen offenbar nur an bestimmten Stellen möglich, wobei nicht klar ist, ob diese sich neutral auswirken oder für die Funktion erforderlich sind.

5)4) Andere Marker auf Chromosom Nr.6

Im Hinblick darauf, daß mindestens die Komplementkomponenten C2 und C4 (44, 75) mit dem HLA-Genort gekoppelt sind, ist es bedeutsam, daß auch der C3-Proaktivator (Bf), nicht aber C3 selbst auf dem Chromosom Nr.6 codiert ist (= Bf-Locus). Damit sind wichtige Faktoren des Effektormechanismus "Komplement" mit in den "Major Histocompatibility Complex" (MHC) eingebaut. Die Vermutung liegt nahe, daß aufgrund der engen Kopplung mit Immunantwortgenen und Immunregulationssystemen auf dem Chromosom Nr.6 auch eine funktionelle Beziehung zwischen Komplementkomponenten und dem MHC besteht.

Enge Kopplung wie zwischen HLA und Bf bedeutet oft Kopplungsungleichgewicht. Es ist daher nicht

unerwartet, daß zwischen S und B8, S und B7, F und BW35 sowie S und A2 Assoziationen bestehen.

Aus Familienuntersuchungen und Untersuchungen auf Rekombinationen ergab sich (R i t t n e r (75), T e i s b e r g (91)), daß Bf zwischen HLA-B und HLA-D lokalisiert ist.

5)5) Rekombinationen

Rekombinationen zwischen HLA-A und B fanden sich in sechs Familien. Eine Frequenzbestimmung war jedoch nicht möglich, da mindestens eine Familie als Rekombinant ausgewählt war. Bei HLA-B - Bf lag die Anzahl der Rekombinanten höher (4 von 44), bei HLA-B - PGM₃ schließlich konnten 20 Rekombinanten bei einer Probengröße von 92 festgestellt werden. Diese Ergebnisse bestätigen die relativen Entfernungen der genannten Marker voneinander, nämlich die enge Kopplung von HLA-A und B (S v e j g a a r d (88)), die geringe Entfernung zwischen HLA-B und Bf (A l l e n (13)) und den relativ großen Abstand von PGM₃ zu HLA-B (L a m m (50)) auf dem Chromosom Nr.6.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß in der durch HLA markierten Region des Chromosoms Nr.6 eine Reihe von bedeutsamen immunologischen Systemen codiert ist:

- 1) Antigenerkennung und Zellproliferation (MLC)
- 2) Zielstrukturen für zellvermittelte Zytotoxizität (HLA-A, HLA-B und HLA-C)
- 3) Strukturen zur "Selbst"-Erkennung (HLA-A und HLA-B)
- 4) Systeme für die Kooperation zwischen T- und B-Zellen (Immunantwort), zwischen T- und T-Zellen und für die Kooperation zwischen Makrophagen und T-Zellen

(beide ebenfalls zur Immunantwort gehörend).

- 5) Systeme zur Regelung der Immunantwort
- 6) Immunantwortgene
- 7) Krankheitsempfänglichkeitsgene
- 8) Gene für Komplementkomponenten

Die enge Kopplung dieser Gene und die funktionellen Beziehungen untereinander legen einen gemeinsamen Ursprung nahe, aus dem durch Duplikation und Mutation die einzelnen Systeme entstanden sein können. Die Gesamtfunktion der Region kann vielleicht als zentrale immunologische Schaltstelle verstanden werden. Es ist daher eher zu erwarten, daß eine Selektion erst auto-genetisch auftritt.

6) ZUSAMMENFASSUNG

1958 beginnt die Geschichte der menschlichen Leukozytenantigene. In diesem Jahr entdeckte D a u s s e t (35) das Antigen MAC (= HLA-A2). Van R o o d (79) beschrieb 1962 das erste diallelische System und P a y n e und B o d m e r (66) fanden im Jahr 1964 das erste multiallelische System, den heutigen ersten Locus des HLA-Systems. Während des dritten internationalen Histocompatibilitätsworkshops 1967 in Turin konnte die Zugehörigkeit der meisten Leukozytenantigene zu einem komplexen immungenetischen System gezeigt werden. Ebenfalls 1967 demonstrierte C e p p e l l i n i (26) mit Hilfe von Hauttransplantaten die Funktion der Leukozytenantigene als Transplantationsantigene. Der vierte Histocompatibilitätsworkshop 1970 in Los Angeles brachte den Beweis für die Unterteilung des HLA-Systems in zwei Loci mit jeweils multiplen Allelen (J o i n t r e p o r t 1970). Im Laufe der letzten Jahre wurden noch weitere HLA-Antigene gefunden, die dem Locus A oder B des HLA-Systems angehören. Darüber hinaus gelang die Entdeckung eines dritten HLA-Locus (HLA-C)(89, 53).

Neben den HLA-Antigenen wurden mit Bf (13, 75, 69) und MLC (16, 42, 98, 58) noch weitere, mit dem HLA-System gekoppelte Gene auf dem Chromosom Nr.6 gefunden. Man faßte sie unter dem Oberbegriff MHC (Major Histocompatibility Complex) zusammen. Eine Kopplung mit den Komplementkomponenten C2, C4 konnte nachgewiesen werden (44, 75). Das steuernde Gen für das PGM₃ (Phosphoglucomutase 3) - System, auf demselben Chromosom lokalisiert (51), liegt in größerer Entfernung vom MHC (51) und gehört diesem nicht an.

1975 wurde von M a y r et al. (54) eine Kopplung des

Genortes für die Ausprägung des Enzyms Glyoxalase (GLO) mit dem HLA-System nachgewiesen.

Inzwischen steht auch die Reihenfolge der Parameter der Kopplungsgruppe des Chromosoms Nr.6 fest:

HLA-A - HLA-C - HLA-B - Bf - HLA-D - GLO - PGM₃ (70).

Für die vorliegende Arbeit bilden die eben genannten Erkenntnisse die Grundlage. An 191 kinderreichen Familien mit insgesamt 679 Nachkommen, davon 342 männlichen und 337 weiblichen Geschlechts, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- 1) Bestimmung der Phänotyp- und Genfrequenzen mit Prüfung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts
- 2) Ermittlung der Haplotypfrequenzen und der zugehörigen Delta-Werte
- 3) Segregationsanalyse
- 4) Kopplung mit anderen Markern des Chromosoms Nr.6
- 5) Rekombinationen

Ad 1) In der vorliegenden Münchner Testgruppe, repräsentativ für die Bevölkerung des süddeutschen Raumes, dominiert bei Locus A des HLA-Systems das Antigen A2. Es macht von der Gesamtzahl aller Locus-A-Antigene etwa 30% aus. Dies geht sowohl aus den Ergebnissen der Genzählung als auch aus der Berechnung mittels der Phänotypdaten hervor. Die niedrigste Antigenfrequenz besitzt HLA-AW30. Bei Locus B ist mit etwa 15% Gesamthäufigkeit (bezogen auf sämtliche Antigene des Locus B) B7 am stärksten vertreten, BW37 wurde am seltensten beobachtet. Signifikante Abweichungen von früheren Untersuchungen konnten nicht festgestellt werden.

Der Test des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts ergab für Locus B sehr gute, für Locus A befriedigende Über-

einstimmung. Die Annahme zweier getrennter HLA-Loci mit jeweils multiplen Allelen wird damit bestätigt.

Ad 2) Die Zählung der Haplotypen und die anschließende Frequenzbestimmung wurde für sämtliche möglichen Kombinationen durchgeführt. Die Frequenz wurde für die häufigen Haplotypen zusätzlich berechnet, wobei sich zur Frequenzbestimmung mittels Haplotypzählung keine wesentlichen Unterschiede ergaben. Wie aufgrund früherer Untersuchungen (10) erwartet werden konnte, ist der Haplotyp A1 - B8 am häufigsten. Seine Frequenz beträgt 0,0890. Aufgrund des hohen positiven Delta-Wertes ergibt sich für diesen Haplotyp ein signifikantes positives Kopplungsungleichgewicht. Ein solches fand sich auch bei A3 - B7, wenngleich weniger ausgeprägt. Bei A2 - B8 ließ sich ein negatives Kopplungsungleichgewicht feststellen. Dies entspricht anderen Ergebnissen aus der Literatur (6, 10).

Ad 3) Die Segregationsanalyse erstreckte sich auf folgende Einzeluntersuchungen:

Segregation einzelner Antigene

Segregation häufiger Haplotypen

Segregation einzelner Antigene bei Berücksichtigung der Familiengröße

Aufteilung der Haplotypkombinationen bei Familien verschiedener Größe

Aufteilung von väterlichen und mütterlichen

Haplotypen in Familien verschiedener Größe

HLA-Identität von erstem und letztem Kind

Erwartungsgemäß lagen die Segregationsfrequenzen der Antigene beider Loci etwa bei 0,5, d.h. kein Antigen wurde bei der Vererbung besonders bevorzugt. Es konnte

zwar festgestellt werden, daß einzelne Antigene ein paternal oder maternal gehäuftes Vorkommen aufweisen; diese Tendenz ließ sich jedoch bei den Nachkommen nicht weiter bestätigen, sodaß die Abweichungen als zufallsbedingt gelten können.

Die HLA-Haplotypen ließen ebenfalls keine signifikant abweichenden Frequenzen erkennen. Eine geschlechtsgebundene Vererbung derselben konnte - wie erwartet - nicht nachgewiesen werden.

Die vorhandenen Familien wurden in Größen von 2-5 (2-5 Nachkommen) aufgeschlüsselt und die Segregation sämtlicher HLA-Antigene für jede der genannten Familiengrößen untersucht. Die größte positive Abweichung von den Erwartungswerten wies HLA-A2 bei Familien mit zwei Kindern auf. Sie betrug nahezu 50%. Mit steigender Familiengröße nahm die Signifikanz der Abweichung allerdings ab. Für die übrigen HLA-Antigene konnten in keiner Familiengruppe auffällige Abweichungen gefunden werden. Allgemein ließ sich erwartungsgemäß eine mit wachsender Familiengröße gleichmäßigere Aufteilung der HLA-Antigene auf die Nachkommen registrieren.

Ebensowenig gelang es, Anhaltspunkte für eine eventuelle bevorzugte Auswahl bestimmter Haplotyp-Kombinationen bei der Vererbung zu finden.

Die genannten negativen Resultate stimmen gut überein mit einer ähnlichen Untersuchung aus dem Jahr 1973 (A l b e r t et al. (10)). Eine an HLA-Antigenen oder Haplotypen angreifende Selektion scheint aufgrund der gefundenen Ergebnisse nicht vorzuliegen. Sollte es dennoch eine solche geben, war sie mit den angewandten Methoden nicht zu erfassen.

Die Prüfung der HLA-Identität von erstem und letztem Kind der vorhandenen Familien ergab keine Abweichungen. Somit läßt auch dieser Test keine Anhaltspunkte für eine Selektion erkennen.

Ad 4) Als weitere Marker auf dem Chromosom Nr.6 wurden das steuernde Gen für die Ausprägung des C3-Proaktivators (Bf) und für das Enzym Phosphoglucumutase 3 (PGM₃) untersucht.

Die Bestimmung der Genfrequenzen der vier Codierungen des Bf-Polymorphismus bestätigte im großen und ganzen frühere Untersuchungen an amerikanischen weißen Kaukasiern (A l p e r (14)), wonach S weitaus am häufigsten ist. Der Anpassungstest nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zeigte gute Übereinstimmung. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß S, F, S1, F1 Allele eines Locus sind.

Bei der Untersuchung der Assoziation von Bf mit HLA-A und B ergaben sich signifikant positive Werte für BW35 - F; B8 - S und eine Reihe weiterer Kombinationen. Auffallend negative Werte fanden sich für BW35 - S; B8 - F und B12 - S.

Sämtliche möglichen HLA-Bf-Zweipunkt-Haplotypen wurden auf ihre Frequenz hin überprüft. Die Kombination A2 - S wurde am häufigsten beobachtet, was aufgrund der hohen Genfrequenzen von A2 und S zu erwarten war.

Für einige ausgewählte HLA-Bf-Zweipunkt-Haplotypen wurden die Delta-Werte berechnet. Diese lagen zwar niedriger als beispielsweise der Delta-Wert von HLA-A1 - B8, sind aber dennoch signifikant.

Die häufigen HLA-Bf-Dreipunkt-Haplotypen entsprachen in ihrer Frequenz den Erwartungswerten. Ein Kopplungsungleichgewicht ergab sich für A1 -B8 - S.

Bei der Bestimmung der Genfrequenzen von PGM₃-1 und PGM₃-2 ließ sich ein Häufigkeitsverhältnis PGM₃-1 zu PGM₃-2 von etwa 3:1 feststellen.

Ad 5) Unter den 191 getesteten Familien fanden sich sechs mit Rekombinationen. Eine Frequenzbestimmung war nicht möglich, da eine der Familien bereits als rekombinante ausgewählt war. Der rekombinante Haplo-
typ wurde am häufigsten dem ersten Kind vererbt. Weitere Untersuchungen erschienen bei der geringen Anzahl der Rekombinationen nicht sinnvoll.

Die Zahl der Rekombinationen war bei HLA-B - Bf höher (4 Rekombinationen bei 44 Familien) und noch höher bei HLA-B - PGM₃.

Besondere Bedeutung haben die Untersuchungen auf Rekombinationen zwischen HLA-A, -B; Bf; HLA-D; GLO und PGM₃ für die Bestimmung der Lokalisation neuer Gene auf dem Chromosom Nr.6.

Als Gesamtergebnis der Segregationsanalyse läßt sich feststellen: Es wurden keine sicheren Anhaltspunkte für Abweichungen von der einfachen Mendelschen Vererbung und dem allelen Verhalten (untersucht mittels Hardy-Weinberg-Gleichgewicht) gefunden. Dies spricht gegen eine Selektion auf der Ebene der Zygote. Da wegen des vielfach beobachteten Kopplungsungleichgewichts dennoch vermutet wird, daß eine Selektion am HLA-Poly-morphismus angreift, wird man diese Selektion im Bereich der Ontogenie, zum Beispiel bei Assoziationen mit Krankheiten, suchen müssen.

7) LITERATURVERZEICHNIS

1. A l b e r t , E.D.; Mickey, M.R.; Mc Nicholas, A.C.
& Terasaki, P.I.: Seven new HL-A specificities
and their distribution in three races. Histo-
compatibility Testing 1970, Munksgaard,
Copenhagen, 221-230.
2. A l b e r t , E.D. (1972): Neue Antigene des HLA-A-
-Systems, Klin.Wochenschrift.
3. A l b e r t , E.D. (1972): Die Bedeutung des HLA-A-
-Systems in Klinik und Forschung. S.Karger,
Basel.
4. A l b e r t , E.D.; Mickey, M.R. and Terasaki, P.I.:
HL-A gene- and haplotype frequencies in
different populations. Proceedings of the
AABB-ISBT Transfusion Congress 1972,
Washington, D.C.
5. A l b e r t , E.D.: Die Immungenetik des Systems
der menschlichen Leukozyten-Iso-Antigene, 1972,
Habilitationsschrift, S.30-31.
6. A l b e r t , E.D.: Die Immungenetik des Systems
der menschlichen Leukozyten-Iso-Antigene, 1972,
Habilitationsschrift, S.57-65.
7. A l b e r t , E.D.: Die Immungenetik des Systems
der menschlichen Leukozyten-Iso-Antigene, 1972,
Habilitationsschrift, S.16-19.

8. A l b e r t , E.D.; Mickey, M.R. & Terasaki, P.I.: Genetics of the HL-A system in four populations: American Caucasians, Japanese Americans, American Negroes and Mexican Americans. Histocompatibility Testing, 1972, Munksgaard, Copenhagen, 1972, pp. 233-240.
9. A l b e r t , E.D.; Scholz, S.; Rosenthal I.; Baltin, H. & Bertrams, J.: Study of the HL-A-System in the Turkish and German populations. Histocompatibility Testing 1972, Munksgaard, Copenhagen, 1972, pp. 147-152.
10. A l b e r t , E.D.; Mickey, M.R.; Ting, A. and Terasaki, P.I.: Deduction of 2140 HL-A Haplotypes and Segregation Analysis in 535 Families. Transplantation Proceedings, Vol.V No.I (March), 1973. Grune & Stratton, Inc.pp.215-221.
11. A l b e r t , E.D.: Die genetischen Systeme der menschlichen Histokompatibilität: Das HL-A-System. "Blut"-Zeitschrift für die gesamte Blutforschung, Band XXVII, Seite 73-80, 1975. J.F.Lehmann Verlag, München.
12. A l b e r t i n i , R.J.; Bach, F.H.: Histocompatibility studies using mixed leucocyte cultures. Proceedings of the III. Annual Leucocyte Culture Conference 1967, pp. 379-391. New York: Appleton Century Crafts.
13. A l l e n , F.H.; Jr.: Linkage of HL-A and GBG. Vox Sang. (Basel) 27, 382-384 (1974).
14. A l p e r , C.A.; Boenisch, T.; Watson, L.: Genetic polymorphism in human glycine-rich B-glycoprotein. J.exp.Med.135, 68-80 (1972).

15. A m i e l , J.L. (1967). Studies of the leucocyte phenotypes in Hodgkin's disease. Histocompatibility Testing 1967, Munksgaard, Copenhagen, p.79.
16. A m o s , D.B. and Bach, F.H.: Phenotypic expression of the major histocompatibility locus in man (HL-A) leucocyte antigens and mixed leucocyte culture reactivity. J.exp. Med. 128 (4), 623-637 (1968).
17. A s q u i t h , P.: Family studies in coeliac disease, in: Coeliac disease - proceedings of the Second International Coeliac Symposium, edited by W.Th. J.M. Hekkens and A.S.Pena, 1974, Stenfert Kroese (Leiden), pp. 322-329.
18. B e l v e d e r e , M.C.; Curtoni, E.S.; Dausset, J.; Lamm, L.U.; Mayr, W.; Rood, J.J.van; Svejgaard, A. and Piazza, A.: On the heterogeneity of linkage estimations between LA and FOUR loci of the HL-A-system. Tissue Antigens, 5:99-102, 1975.
19. B e r t r a m s , J.; Grosse-Wilde, H.; Netzel, B.; Mempel, W. and Kuwert, E.: SD-HL-A 3-7-LD Pi (7a): A caucasian histocompatibility super haplotype with increased susceptibility to multiple sclerosis. Histocompatibility Testing 1975, Munksgaard, Copenhagen, 1975, pp.782-787.
20. B o d m e r , W.; Tripp, M. & Bodmer, J. (1967): Application of a fluorochromatic cytotoxicity assay to human leucocyte typing. Histocompatibility Testing, 1967, pp. 341-350. Munksgaard, Copenhagen.

21. B o d m e r , W.F.; Bodmer, J.G. and Tripp, M.:
Recombination between the LA and FOUR loci
of the HL-A-system. Histocompatibility
Testing 1970, Munksgaard, Copenhagen.
22. B o d m e r , W.F.: Joint report of the Fourth
International Histocompatibility Workshop,
Los Angeles, 1970. Histocompatibility
Testing, Munksgaard, Copenhagen, 1970,
pp. 17-47.
23. B o y u m , A.: Separation of leucocytes from
blood and bone marrow. Scand.J. clin.Lab.
Invest. (Suppl.97), 21 (1968).
24. C a v a l l i - S f o r z a , L.L.; Bodmer, W.F.:
The genetics of human populations, p.243, 1971
by W.H.Freeman and Company.
25. C e p p e l l i n i , R.; Curtoni, E.S.;
Mattiuz, P.L.; Migliano, V.; Scudeller, G. &
Serra, A.; (1967) Genetics of leucocyte anti-
gens. A family study of segregation and lin-
kage. Histocompatibility Testing, 1967,
pp. 149-185. Munksgaard, Copenhagen.
26. C e p p e l l i n i , R.; (1967): A preliminary
report on the 3rd international workshop on
histocompatibility testing. Advance in Trans-
plantation, pp.195-202. Munksgaard, Copenhagen.
27. C e p p e l l i n i , R.: Genetica delle Immuno-
globuline, XII Annual Meeting of Associazione
Genetica Italiana Parma, A.G.I. 12, 3, 1967.

28. C e p p e l l i n i , R.; (1971): Old and new facts and speculations about transplantation antigens of man. Progress in Immunology 1, 973-1025, Acad.Press, New York.
29. C h r i s t y , M.; Buschard, K.; Nerup, J.; Platz, P.; Svejgaard, A.; Thomsen, M.; Ryder, L.P.: Family studies of the association between HL-A and juvenile diabetes mellitus, in : HL-A and disease, 1976, ed. INSERM, Paris, 1976, p. 123.
30. C o l o m b a n i , J.; Colombani, M.; Benajam, A. & Dausset, J. (1967): Leucocyte and platelet antigens defined by platelet complement fixation test (antigens 1,5,6,11 and 14). Histocompatibility Testing 1967, pp. 413-417, Munksgaard, Copenhagen.
31. C o l o m b a n i , M.; Colombani, J.; Dehay, C. & Dausset, J. (1970): A microtechnique of platelet complement fixation. Results obtained with sera and eluates as the source of antibody. Histocompatibility Testing, 1970, Munksgaard, Copenhagen. pp.553-560.
32. C u d w o r t h , A.G. and Woodrow, J.C.: The HLA-system and diabetes mellitus, in: HLA and disease, 1976, ed. INSERM, Paris, 1976, p.125.
33. D ' A m a r o , J.; Leeuwen, A. van; Rood, J.J. van & Svejgaard, A. (1970: The microcomplement-fixation test, II. Serologic and comparative studies. Histocompatibility Testing, 1970, Munksgaard, Copenhagen. pp. 539-542.

34. D a u s s e t , J. (1954): Leuco-agglutinins. IV.
Leuco-agglutinins and blood transfusion.
Vox Sang. (Basel), 4, 190-198.
35. D a u s s e t , J. (1958): Iso-leucoanticorps,
Acta haemat. (Basel) 20, 156-166.
36. D a u s s e t , J.; Colin, M. & Colombani, J.
(1960): Immune platelet isoantibodies.
Vox Sang. (Basel), 5, 4-31.
37. D a u s s e t , J. (1962): The leukoagglutinins,
Transfusion 2, 209-215.
38. D a u s s e t , J. (1963): Leukocyte agglutination.
Methods of Immuno-haematologic Research, pp.
31-65. Bibl.Haematol., Vol.14.
39. D a u s s e t , J.; Rapaport, F.T.; Legrand, L.;
Colombani, J. & Marcelli-Bare, A. (1970):
Skin allograft survival in 238 human subjects.
Role of specific relationships at the four
gene sites of the first and the second HL-A
loci. Histocompatibility Testing, 1970.
Munksgaard, Copenhagen. pp. 381-398.
40. D a u s s e t , J. and Hors J.: L'Association
France-dans le système HL-A. La Nouvelle
Presse medicale 1972, pp. 1273-1279.
41. E g o r o v , J.K.; Vedernikov, A.A.; Malenko, A.F.;
Mnatsakanyan, Y.A.: Serologically defined HL-A
antigens in Moscow caucasoid population.
Histocompatibility Testing 1975, Munksgaard,
Copenhagen, 1975, pp. 186-187.

42. E i j s v o o g e l , V.P.; Koning, L.;
de Groot-Kooy, L.; Huismans, L.; Rood, J.J.van;
Leeuwen, A. van and du Toit, E.D.: Position of
the locus determining mixed lymphocyte reaction
apart from the HL-A region. Histocompatibility
Testing 1972, Munksgaard, Copenhagen. pp.501-508.
43. F r i e d m a n n , E.A.; Retan, J.W.; Marshall, D.C.;
Henry, L. & Merrill, J.P. (1961): Accelerated
skin graft rejection in humans preimmunized
with homologous peripheral leucocytes.
J.clin. Invest. 40, 2162-2170.
44. F u , S.M.; Stern, R.; Kunkel, H.G.; Dupont, B.;
Hansen, J.A.; Day, N.K.; Good, R.A.; Jersild, C.
and Fotino, M.: LD-ta association with C2 defi-
ciency in five of six families. Histocompati-
bility Testing 1975, Munksgaard, Copenhagen
1975, pp. 933-936.
45. G ö t z e , O.; Müller-Eberhard, H.J.: The C3-acti-
vator system. An alternative pathway of comple-
ment activation. J.exp.Med. 134, 89-95 (1971 b).
46. G o r e r , P.A.: Antigenetic basis of tumor trans-
plantation. J.Path.Bact. 47, 231 (1938).
47. H a r m s , K.; Granditsch, G.; Rossipal, E.
Ludwig, H.; Polymendis, Z.; Scholz, S.;
Wank, R. and Albert, E.D.: HL-A patients with
coeliac disease and their families, in:
Coeliac disease-proceedings of the Second
International Coeliac Symposium, edited by
W.Th.J.M.Hekkens and A.S.Pena, 1974, Stenfert
Kroese B.v. (Leiden), pp.215-228.

48. H o o f f , J.P. van; Steen, G.J. van der;
Schipper, H.M.A. and Rood, J.J. van:
Efficiency of HL-A matching in Eurotransplant.
The Lancet, Dec. 30, 1385-1388 (1972).
49. K i s s m e y e r - N i e l s e n , F. &
Kjerbye, K.E. (1967): Lymphocytotoxic micro-
technique. Purification of lymphocytes by
flotation. Histocompatibility Testing 1967,
pp. 381-383. Munksgaard, Copenhagen.
50. L a m m , L.U.; Svejgaard, A.; Kissmeyer-Nielsen, F.:
PGM₃-HL-A is another linkage in man. Nature
(London) New Biol. 231, 109-110 (1971).
51. L a m m , L.U.; Kissmeyer-Nielsen, F.; Svejgaard, A.;
Bruun-Petersen, G.; Thorsby, E.; Mayr, W. and
Högman, C.: On the Orientation of the HL-A
Region and the PGM₃ Locus in the Chromosome.
Tissue Antigens, (1972), 2, 205-214.
Munksgaard, Copenhagen.
52. M a t t i u z , P.L.; Ihde, D.; Piazza, A.;
Ceppellini, R. & Bodmer, W.F. (1970): New
approaches to population genetic and segre-
gation analysis of the HL-A System. Histo-
compatibility Testing, 1970, pp. 193-205.
Munksgaard, Copenhagen.
53. M a y r , W.R. (1974): Neue Untersuchungen im Be-
reich des HL-A Systems: ein dritter Locus mit
serologisch nachweisbaren Merkmalen. Folia
Haematol. 101, 401.

54. M a y r , W.R.; Mayr, D.; Kömpf, J.; Bissbort, S. and Ritter, H.: Possible linkage of HL-A and GLO. Human Genetics 31, 241-242, 1976 by Springer Verl. 1976.
55. Mc C a r t h y , C.F.; Mylotte, M.; Stevens, F.; Egan-Mitchell, B.; Fottrell, P.F.; Mc Nicholl, B.: Family studies on coeliac disease in Ireland, in: Coeliac disease-proceedings of the Second International Coeliac Symposium, edited by W.Th.J.M. Hekkens and A.S.Pena, 1974, Stenfert Kroese (Leiden), pp. 311-320.
56. Mc N e i s h , A.S.; Rolles, C.J.; Nelson, R.; Kyaw-Myint, T.O.; Mac-Kintosh, P. and Williams, A.F.: Factors affecting the differing racial incidence of coeliac disease, in: Coeliac disease-proceedings of the Second International Coeliac Symposium, edited by W.Th.J.M.Hekkens and A.S.Pena, 1974, Stenfert Kroese (Leiden), pp. 330-338.
57. M e d a w a r , P.B.: Immunity to homologous grafted skin. II. The relationship between the antigens of blood and skin. Brit.J.Exp.Path. 27, 15 (1946).
58. M e m p e l , W.; Grosse-Wilde, H. and Albert, E.D.: MLC reactions between unrelated HL-A typed persons. 4th ann. Meet.German Tissue Typing Laboratories, Zeitschrift für Immunitätsforschung, 1973, 144, p 433.

59. M i c k e y , M.R.: Joint report of the Fourth International Histocompatibility Workshop, Los Angeles, 1970. Histocompatibility Testing, 1970, pp. 17-47, Munksgaard, Copenhagen.
60. M i c k e y , M.R.; Kreisler, M. & Terasaki, P.I.: Leucocyte antigens and Disease II. Alterations in frequencies of haplotypes associated with chronic glomerulonephritis. Histocompatibility Testing 1970, Munksgaard, Copenhagen, 1970, pp. 237-242.
61. M i c k e y , M.R.; Terasaki, P.I.; Kreisler, M.; Albert, E.D. & Sengar, D.P.S.: Analysis of histocompatibility data from 1000 kidney transplants. Tissue Antigens, Vol.I, No.2, 1971, 57-67.
62. N e t z e l , B.; Grosse-Wilde, H.; Rittner, C.; Pretorius, A.M.G.; Scholz, S. and Albert, E.D.: HL-A/MLC recombination frequency and LD typing in HL-A/MLC/Bf/PGM₃ recombinant families. Histocompatibility Testing, 1975, Munksgaard, Copenhagen, 1975, pp. 955-959.
63. O l i v e r , R.T.D.; Sachs, J.A.; Festenstein, H.; Pegrum, G.D. and Moorhead, J.F.: Influence of HL-A matching, antigenic strength, and immune responsiveness on outcome of 349 cadaver renal grafts. 3 Years experience of the London Transplant Group. The Lancet, Dec. 30, pp. 1381- 1385 (1972).

64. P a t e l , R.; Mickey, M.R. & Terasaki, P.I.
(1969): Leucocyte antigens and disease.
I.Association of HL-A2 and chronic glomeru-
lonephritis. Brit.med. J. 2, 424-426.
65. P a y n e , R. & Rolfs, M.R. (1958): Fetomaternal
leucocyte incompatibility. J.clin.Invest:37,
1756-1763.
66. P a y n e , R.; Tripp, M.; Weigle, J.; Bodmer, W.
& Bodmer, J. (1964): A new leucocyte isoanti-
gen system in man. Cold Spr.Harb.Symp.quant.
Biol.29, 285-295.
67. P a y n e , R. (1964): An agglutination technique
for the demonstration of leucocyte isoantigens
in man. Histocompatibility Testing, 1964, pp.
149-155. National Academy of Sciences.
Washington, D.C.
68. P i a z z a , A.: Haplotypes and linkage disequi-
libria from the three-locus-phenotypes. Histo-
compatibility Testing 1975, Munksgaard,
Copenhagen, 1975, pp.923-927.
69. P i l l e m e r , L.; Blum, L.; Lepow, J.H.:
The properdin system and immunity. XIII:
Assay and properties of a heat-labile serum
factor (factor B) in the properdin system.
Z.Immun.Forsch. 118, 350-356 (1959).
70. P r e t o r i u s , A.M.G.; Scholz, S.; Kuntz,B.
and Albert, E.D., 1976: Investigations of the
red cell glyoxalase (GLO) in recombinant
families. European Journal of Immunology,
Vol.6, No.10, pp.759-761.

71. P r e t o r i u s , A.M.G.: Tissue Typing Laboratory, Kinderpoliklinik München, persönliche Mitteilung.
72. R a c e , R.R. & Sanger, R. (1968): Blood Groups in Man. 5th ed. Blackwell Scientific-Publ., Oxford.
73. R i t t n e r , Chr.; Grosse-Wilde, H.; Rittner, B.; Netzel, B.; Scholz, S.; Lorenz, H. and Albert, E.D.: Linkage Group HL-A-MLC-Bf (Properdin Factor B). The Site of the Bf Locus at the Immunogenetic Linkage Group on Chromosome 6. Humangenetik 27, 173-183 (1975) by Springer-Verlag 1975.
74. R i t t n e r , Ch.: Institut für gerichtliche Medizin der Universität Bonn.
75. R i t t n e r , Ch.; Hauptmann, G.; Grosse-Wilde, H.; Grosshans, E.; Tongio, M.M. and Mayer, S.: Linkage between HL-A and genes controlling the Synthesis of the fourth component of complement. Histocompatibility Testing 1975, Munksgaard, Copenhagen, 1975, pp. 945-954.
76. R i t t n e r , Ch.; Rittner, B.; Scholz, S.; Lorenz, H.; Albert, E.D.: Data on a "new" linkage group: HL-A-Bf (Factor B of the properdin system). Z. Immun.Forschung (Abstr.), 1975, 148, p 381.
77. R o o d , J.J. van; Eernisse, J.G. & Leeuwen, A. van (1958): Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. Nature (London) 181, 1735-1736.

78. R o o d , J.J. van; Leeuwen A. van & Eernisse, J.G.
(1959): Leucocyte antibodies in sera of pregnant women. Vox Sang. (Basel) 4, 427-444.
79. R o o d , J.J. van (1962): Leucocyte, Grouping,
Thesis, Leiden.
80. S h u l m a n , N.R.; Aster, R.H.; Pearson, H.A.
and Hiller, M.C.: Immunoreactions involving
platelets. VI. Reactions of maternal iso-
antibodies responsible for neonatal purpura.
Differentiation of a second platelet antigen
system. J.Clin.Invest., 1962, 41, 5, 1059-1069.
81. S n e l l , G.D.; Dausset, J.; Nathenson, S.;
Histocompatibility Ch.IV: General conception
and evolution of the HLA-system, pp.217-221.
Academic Press (New York), 1976.
82. S p e n c e r , N.; Hopkinson, D.A.; Harris, H.:
Phosphoglucomutase polymorphism in man.
Nature (London), 1964. pp. 742-745.
83. S t a u b - N i e l s e n , L.; Ryder, L.P. and
Svejgaard, A.: The third (AJ). Segregant
Series. Histocompatibility Testing 1975,
Munksgaard, Copenhagen, 1975, pp. 324-329.
84. S t o r b , R.; Bryant, J.I.; Buckner, C.D.;
Clift, R.A.; Fefer, A.; Fialkow, P.J.;
Johnson, F.L.; Neiman, P. and Thomas, E.D.:
Allogeneic Marrow Grafting for Acute Lympho-
blastic Leukemia: Leukemic Relapse. Trans-
plantation proceedings, in press (1972).

85. S v e j g a a r d , A. & Kissmeyer-Nielsen, F.
(1968 b): Complement-fixing platelet iso-anti-
bodies. I.A. quantitative technique for their
detection. Vox Sang. (Basel) 14, 106-118.
86. S v e j g a a r d , A. (1969a): Iso-antigenic
systems of human blood platelets. A survey.
Series Haemat.II, No.3.
87. S v e j g a a r d , A.; Kissmeyer-Nielsen, F. &
Thorsby, E. (1970b): HL-A typing of platelets.
Histocompatibility Testing, 1970. Munksgaard,
Copenhagen.
88. S v e j g a a r d , A.; Bratlie, A.; Hedin, P.J.;
Högman, C.; Jersild; Kissmeyer-Nielsen, F.;
Lindblom, B.; Lindblom, A.; Low, B.;
Messeter, L.; Moller, E.; Sandberg, L.;
Staub-Nielsen, L. and Thorsby, E.: The recom-
bination fraction of the HL-A system. Tissue
Antigens, 1971, 1, 81-88.
89. S v e j g a a r d , A.; Staub-Nielsen, L.;
Ryder, L.P.; Kissmeyer-Nielsen, F.; Sandber, L.;
Lindholm, A. and Thorsby, E. (1973): Subdivi-
sions of HL-A antigens. Evidence of a "new"
segregant series. Histocompatibility Testing
1972, p. 465, Munksgaard, Copenhagen.
90. T e i s b e r g , P.: High voltage agarose gel
electrophoresis in the study of the C3 poly-
morphism. Vox Sang. (Basel) 19, 47-56 (1970).

91. T e i s b e r g , P.; Olaisen, B.; Gedde-Dahl, T.; Thorsby, E.: On the localisation of the Gb locus within the MHS region of chromosome No.6. Tissue Antigens 5, 527-561, 1975.
92. T e r a s a k i , P.I. & Mc Clelland, J.D. (1964): Microchoplet assay of human serum cytotoxins. Nature (London) 204, 998-1000.
93. T h o r s b y , E. and Piazza, A.: Joint report of the sixth internat.Histocompat.Workshop Conference. II. Typing for HLA-D (LD-I or MLC) determinants. Histocompatibility Testing 1975, Munksgaard, Copenhagen, 1975, pp.414-422.
94. T o s i , R.M.; Pellegrino, M.; Scudeller, G. & Ceppellini, R. (1967): The agar fluorochromasia cytotoxicity test for typing of lymphocytes and other cell types. Histocompatibility Testing, 1967, pp.351-356. Munksgaard, Copenhagen.
95. T r u o g , P.; Steiger, J.; Contu, L.; Galfré, G.; Trucco, M.; Bernoco, D.; Bernoco, M.; Brigen, I.; Dolivo, P. and Ceppellini, R.: Ankylosing spondylitis (AS): A population and family study using HL-A serology and MLR. Histocompatibility Testing 1975, Munksgaard, Copenhagen, 1975, pp. 788-796.
96. W a l f o r d , R.L.; Smith, G.S. & Waters, H. (1971): Histocompatibility systems and disease states with particular reference to cancer. Transplant.Rev. 7, 78.

97. W e i t k a m p , L.R.: Linkage of GLO with HLA and Bf. Effect of population and sex on recombination frequency. in: Tissue antigens, 1976, Vol.7, No.5, May 1976, Munksgaard, Copenhagen, pp. 273-279.
98. Y u n i s , E.J.; Plate, J.M.; Ward, F.E.; Seigler, H.F. and Amos, D.B.: Anomalous MLR responsiveness among siblings. Transplant. Proc. 3, 118-120 (1971).
99. Z o l l i n g e r , H.U.: Pathologische Anatomie, Bd.I., 4.Auflage; S.202, Georg Thieme Verlag (Stuttgart).

Ab 15. Oktober 1970 war ich ohne Wechsel an der Ludwig-Maximilians-Universität München immatrikuliert. Nach einem Semester Biologie konnte ich im Sommersemester 1971 das Studium der Humanmedizin beginnen.

Am 27. März 1972 bestand ich die "Naturwissenschaftliche Vorprüfung" (Vorphysikum), am 9. April 1973 die "Ärztliche Vorprüfung" (Physikum).

Als Famulus war ich am Kreiskrankenhaus Tegernsee (Chirurgie) und am Schwabinger Krankenhaus (Innere Medizin) tätig.

Am 16. Juni 1977 habe ich mit der letzten von 12 Prüfungen das Staatsexamen erfolgreich beendet.

LEBENS LAUF

Am 6. September 1948 wurde ich, Harald Lorenz, als Sohn des Verwaltungsangestellten Walter Lorenz und dessen Ehefrau Ernestine, geborene Treiß, in Rötze, Landkreis Waldmünchen, geboren.

Meine ersten Lebensjahre verbrachte ich bei meinen Großeltern in Bodenwöhr/Opf., wo ich 1954 in die dortige Volksschule aufgenommen wurde. Im gleichen Jahr kam mein einziger Bruder, Günter, zur Welt.

Nach fünf Jahren Volksschule trat ich 1959 in die Oberrealschule Dachau ein. Zwei Umzüge meiner Eltern brachten mich 1961 an das Aventinus-Gymnasium Burg hausen und 1966 an das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium Tegernsee. Im Jahr 1969 legte ich dort die Reifeprüfung mit gutem Erfolg ab.

Am 1. Juli 1969 wurde ich im Rahmen des Grundwehrdienstes zur Bundeswehr (Luftwaffe) nach Kiliansdorf bei Nürnberg in das dortige II./LAR 3 beordert, wo ich die militärische Grundausbildung absolvierte.

Anschließend kommandierte man mich als Reserveoffiziersanwärter zu einem Fahnenjunkerlehrgang nach Gürzenich bei Köln, den ich erfolgreich beendete. Ab 1. Januar 1970 war ich wieder in meiner alten Einheit als Ausbilder tätig.

Um mein Studium aufnehmen zu können, wurde ich am 10. Oktober 1970 vom Wehrdienst beurlaubt. Am 1. Januar 1971 beendete ich meine Dienstzeit offiziell als Fähnrich d.R.

